

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.



25.04.96

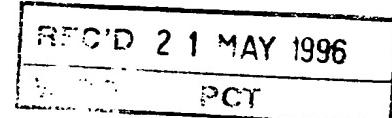
日本国特許庁 08/913355  
 PATENT OFFICE  
 JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
 いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
 with this Office.

出願年月日  
 Date of Application:

1995年10月27日



出願番号  
 Application Number:

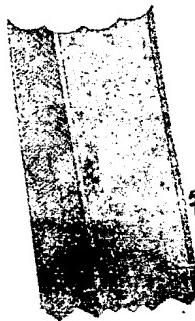
平成 7年特許願第303492号

出願人  
 Applicant(s):

住友電気工業株式会社



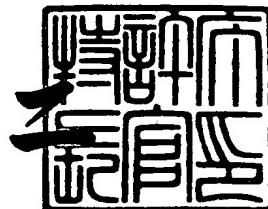
PRIORITY DOCUMENT



特許庁長官  
 Commissioner,  
 Patent Office

1996年 4月12日

清川佑



出証番号 出証特平08-3021133

【書類名】 特許願  
【整理番号】 95YA0432  
【提出日】 平成 7年10月27日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07K 15/28  
G01N 35/53  
C12N 15/13  
【発明の名称】 Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体  
及びその製造方法  
【請求項の数】 41  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部免疫学  
教室内  
【氏名】 樋垣 伸彦  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部免疫学  
教室内  
【氏名】 八木田 秀雄  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部免疫学  
教室内  
【氏名】 奥村 康  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会  
社横浜製作所内  
【氏名】 中田 元巳  
【特許出願人】  
【識別番号】 000002130  
【氏名又は名称】 住友電気工業株式会社

【代表者】 倉内 憲孝

【代理人】

【識別番号】 100093528

【弁理士】

【氏名又は名称】 西川 繁明

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第 87420号

【出願日】 平成 7年 3月20日

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証の写 5

【援用の表示】 変更を要しないため省略する。

【包括委任状番号】 9003720

【書類名】 明細書

【発明の名称】 Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項2】 Fasリガンドの種がヒトである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項3】 Fasリガンドの種がマウスである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項4】 マウス起源のモノクローナル抗体である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項5】 工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5044(ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045(ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046(ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047(ハイブリドーマNOK4)、及びFERM BP-5048(ハイブリドーマNOK5)として寄託されているハイブリドーマ細胞株のいずれか1つから産生されるモノクローナル抗体である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項6】 ヒトFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体である請求項5記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項7】 ヒトの細胞上のFasリガンドあるいは可溶性Fasリガンドを認識し、かつ、サルの細胞表面上のFasリガンドをも認識することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項8】 FasとFasリガンドとの生理的な反応よりも強くFasリガンドと結合することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項9】 FasリガンドとFasとの生理的反応を抑制することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項10】 FasリガンドとFasとの生理反応の抑制が、Fasリガンド発現細胞が分泌する可溶性FasリガンドあるいはFasリガンド発現細胞の表面に存在するFasリガンドにより引き起こされるFas発現細胞のアポトーシスの抑制である請求項9記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項11】 可溶性FasリガンドがFas発現細胞に対して引き起こすアポトーシスを90%以上のアポトーシス抑制率（ただし、アポトーシス抑制率とは、Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釈液中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、一方、Fasを遺伝子導入した細胞をターゲット細胞とし、両者を96ウェルプレート中で100μlの反応系で反応させ、ターゲット細胞の16時間後の生存率を生細胞数検出試薬を用いて測定する細胞障害反応試験において、抗体を添加したときのターゲット細胞の生存率である。）で抑制する請求項10記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項12】 モノクローナル抗体が前記ハイブリドーマNOK1ないしNOK5のいずれか1つのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体であって、Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釈液中に中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、その希釈液25μlを用い、一方、Fasを遺伝子導入した細胞（Fas/WR19L）をターゲット細胞とし、該細胞の濃度 $2 \times 10^5 / ml$ 液50μlを用い、そして、前記モノクローナル抗体を含むハイブリドーマの培養上清25μlを用い、これらのすべてを混合した後、37℃で16時間反応させたとき、ターゲット細胞の生存率（すなわち、アポトーシス抑制率）を90%以上とすることができる請求項11記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項13】 アポトーシスの抑制活性がFas-Igキメラ分子よりも高い請求項10記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項14】 Fas-Igキメラ分子に比べて、Fasリガンドに対する抗体濃度が20倍低濃度でも高いアポトーシスの抑制活性を示す請求項13記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項15】 FasリガンドとFasとの生理的反応を抑制する点において、ヒトのFasリガンドの生理的反応は抑制することができるが、マウスのFasリガンドの生理的反応は抑制できない請求項9記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項16】 Fasリガンド発現細胞の培養上清中に存在する可溶性Fasリガンドをアフィニティー精製することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項17】 Fasリガンド発現細胞上のFasリガンド分子あるいは培養液中に分泌された可溶性Fasリガンド分子を免疫沈降することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項18】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列の①30番目のSerから34番目のAsn、②49番目のArgから65番目のGly、及び③93番目のTyrから109番目のTyrであり、(3)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列の①24番目のArgから34番目のAsn、②50番目のTyrから56番目のSer、及び③89番目のGlnから97番目のThrである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項19】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5045として寄託されているハイブリドーマNOK2が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列の①30番目のAsnから34番目のGly、②49番目のTyrから65番目のGly、及び③93番目のTyrから107番目のTyrであり、(3)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列の①24番目のLysから39番目のGly、②55番目のLeuから61番目のSer、及び③95番目のGlnから102番目のThrである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

ナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項20】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5046として寄託されているハイブリドーマNOK3が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列の①30番目のSerから34番目のAsn、②49番目のArgから65番目のGly、及び③93番目のTyrから105番目のValである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項21】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5047として寄託されているハイブリドーマNOK4が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列の①32番目のTyrから35番目のAsn、②50番目のTyrから65番目のAsn、及び③93番目のTyrから107番目のTyrであり、(3)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列の①24番目のArgから38番目のHis、②54番目のArgから60番目のSer、及び③93番目のGlnから101番目のThrである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項22】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5048として寄託されているハイブリドーマNOK5が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列の①30番目のThrから34番目のHis、②49番目のTyrから65番目のAsp、及び③93番目のTyrから106番目のTyrであり、(3)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列の①24番目のLysから34番目のAla、②50番目のTyrから56番目のThr、及び③89番目のGlnから97番目のThrである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項23】 請求項18ないし22のいずれか1項に記載のモノクロ-

ナル抗体またはその活性フラグメントであって、請求項18ないし22のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の超可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNA。

【請求項24】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列であり、(3)L鎖の可変領域が配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項25】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5045として寄託されているハイブリドーマNOK2が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列であり、(3)L鎖の可変領域が配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項26】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5046として寄託されているハイブリドーマNOK3が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項27】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5047として寄託されているハイブリドーマNOK4が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、(3)L鎖の可変領域が配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項28】 ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5048として寄託されているハイブリドーマNOK5が產生する抗体

と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列であり、(3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【請求項29】 請求項24ないし28のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、請求項24ないし28のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNA。

【請求項30】 (1) 動物を、Fasリガンド分子またはFasリガンドを発現させた細胞で免疫感作する、(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する、(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、(6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする、(7) 所望の抗体を分泌しているクローンを選択する、(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する、(9) このハイブリドーマの培養上清液あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含むことを特徴とするFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項31】 工程(1)において、機能的なFas分子を発現していない動物(ヒトを除く)に、Fasリガンド分子またはFasリガンド発現細胞を免疫感作する請求項30記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項32】 動物が、MRL 1pr/1prマウスに属する齧歯類動物である請求項30記載の製造方法。

【請求項33】 Fasリガンドを発現させた細胞がCOS細胞である請求

項30記載の製造方法。

【請求項34】 ミエローマ細胞が、P3X63Ag8.653である請求項30記載の製造方法。

【請求項35】 細胞表面に存在するFasリガンドまたは可溶性リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項36】 Fasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、溶液中のFasリガンドを検出する方法。

【請求項37】 複数のモノクローナル抗体のうち、一種のモノクローナル抗体を担体に固定し、他種のモノクローナル抗体を標識化合物で標識し、そして、モノクローナル抗体を固定した担体をFasリガンドを含むと思われる検体の溶液に浸漬して検体を吸着させ、吸着した検体を標識化合物で標識したモノクローナル抗体により検出する請求項36記載の検出方法。

【請求項38】 IgMタイプの精製したモノクローナル抗体を担体に固定し、IgGタイプのビオチン標識したモノクローナル抗体により、溶液中のFasリガンドを検出する請求項37記載の検出方法。

【請求項39】 Fasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせてなるFasリガンド検出用キット。

【請求項40】 Fasリガンド分子の濃度が少なくとも0.4325ng/mlである溶液中のFasリガンドを検出することができる請求項39記載のキット。

【請求項41】 伝染性单核球症(IM)、全身性エリテマトーデス(SLE)、または肝炎(Hepatitis)に罹患したヒトの血液中のFasリガンドの濃度を検出する請求項39記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、Fasリガンドの検出方法、及びFasリガンドを検出するためのキットに関する。また、本発明は、細胞表面に存在するF

*a s* リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマに関する。本発明のモノクローナル抗体は、細胞死における F *a s* システム等の解明、免疫治療や診断、F *a s* リガンドの検出、これらに関連した産業分野において有用である。

本発明において、活性フラグメントとは、抗体の抗原抗体反応活性を有するフラグメントを意味し、具体的には、F (a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a b、F v、及び組み換え F v 体等を挙げることができる。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

多細胞生物は、その恒常性を保つために、細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体発生の過程では、多くの細胞が細胞死によって除去される。また、成体においても、臓器を構成する細胞は、常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。このような細胞死は、予め予定された死であり “programmed cell death” とよばれ、物理的・化学的原因で引き起こされる不慮の死 “accidental cell death” と区別されている。これらの2つの死は、その過程が異なっている。すなわち、プログラム細胞死は、アポトーシスの過程によって起こるのに対し、アクシデントルな細胞死では、ネクローシス（壊死）の過程を経て細胞が死滅する。

#### 【0003】

F *a s* 抗原は、細胞死（アポトーシス）を媒介する細胞表面蛋白質である。最近、大阪バイオサイエンス研究所の伊藤直人博士・長田重一博士らの共同により F *a s* 抗原の cDNA がクローニングされた (Cell, Vol. 66, p. 223-243, 1991)。得られた cDNA の構造から、ヒト F *a s* 抗原は、アミノ酸 319 残基からなる細胞膜貫通型蛋白質であり、1つの細胞膜貫通部分を有することが分った。F *a s* 抗原の細胞外部分は、アミノ酸 157 残基から構成され、システイン残基に富む構造を有している。マウス F *a s* 抗原は、アミノ酸 306 残基からなり、ヒト F *a s* 抗原と 49.3% の相同性を示す。

#### 【0004】

F *a s* 抗原における細胞外部分のシステイン残基に富む構造は、NGF（神経

成長因子：nerve growth factor) の低親和性レセプターや TNF (腫瘍壞死因子：tumor necrosis factor) のレセプターにも認められるよく保存された構造であることが判明した。これらの事実から、Fas抗原が、NGF/TNFレセプターファミリーに属する細胞表層蛋白質であることが明らかとなった。このファミリーに属する蛋白質の多くは、生体内にそのリガンドを有しているので、Fas抗原にも生体内にリガンドが存在していることが予想されていたが、1993年大阪バイオサイエンス研究所の長田重一博士のグループによりラットのFasリガンドの分子が同定された (Cell, Vol. 75, p. 1169-1178, 1993)。続いて、マウス及びヒトのFasリガンドの分子が、同グループにより同定された (Int. Immunol., Vol. 6 No. 10, p. 1567-1574)。

#### 【0005】

Fas抗原は、細胞に“死”というシグナルを伝えることが明らかになってい。抗Fas抗体は、ある種の細胞にアポトーシスを誘導する。また、自己免疫疾患様の症状を示すlpr (lymphoproliferation) 変異をもつマウスでは、Fas遺伝子に変異が存在していることが見出されている。これらの結果から、Fas抗原などのアポトーシスを媒介する蛋白質の不活性化が細胞の異常増殖を引き起こし、一方、その異常な活性化がある種の炎症反応を引き起こすことが示唆されている。

#### 【0006】

例えば、エイズ原因ウイルスHIV感染T細胞には、Fasの発現が認められること、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990年)、抗Fas抗体 (Jo-2) をマウスに腹腔投与すれば、マウスは劇症肝炎を起こして死ぬこと (Nature, vol. 364, p. 806-809, 1993年)、ウィルス性肝炎では、Fasの発現が認められること (Hepatology, vol. 19, p. 1354-1359, 1994年)、自己免疫疾患においても、SLE (全身性エリテマトーデス) やRA (慢性関節リウマチ) で報告がなされている。これらはFas抗原に反応するFasリガンドによって引き起こされているのではないかと推察でき

るが、実際に確かめるには膨大な実験が必要である。

【0007】

このように、Fas抗原の研究によって、免疫系では、細胞の外から“死”というシグナルを伝える系が働いていることが証明されている。しかしながら、発生や神経細胞での細胞死は、同様に外からのシグナルにより誘導されているのか（Fasのシステムが働いているのか）、それともプログラム細胞死とよばれるように、細胞の中でプログラムされているのかは、未だに不明であり、その解明は、今後の大きな課題である。

【0008】

細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構、すなわち、Fas抗原からどのようなシグナル伝達機構によって、アポトーシスが誘導されるのかという問題も解明されていない。Fasのシステムを正確に理解するには、Fas抗原のリガンド（Fasリガンド）とその機能を明らかにし、リガンドとレセプターとの相互作用という観点からFasのシステムを見直す必要がある。

Fasリガンドは、先述のごとく、長田重一博士らによりその遺伝子が同定された。その結果、前記“Cell”の文献によれば、Fasリガンドは、278個のアミノ酸からなる分子量31,138の蛋白質であること、また、4カ所のN-グリコシド結合サイトがあり、糖蛋白質であること等が判明している（細胞工学、Vol. 13 No. 8, p 738-744, 1994）。

【0009】

また、Hanabuchiらの文献（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934, 1994）の報告によれば、キラーT細胞によるFas抗原を介した標的細胞破壊機構の解析の結果、パーフォリンを発現していないCD4<sup>+</sup>T細胞（CTL）による標的細胞破壊には、標的細胞上のFas抗原を介したアポトーシス・シグナルの伝達が関与している可能性が示され、それによってCD4<sup>+</sup>CTLの細胞表面にFasリガンドが存在していることが明らかになった。

さらには、自己免疫疾患様の症状を示すgld（generalized lymphoproliferative disease）変異をもつマウスで

は、Fasリガンドに変異が存在することが見い出されている (Cell, Vol. 76, p. 969-979, 1994)。

【0010】

しかし、現状は、Fasリガンドが生体の反応で重要であるのではないかとの認識がようやく得られたばかりである。このように、現在、Fasリガンドの分子が同定されたばかりであり、FasとFasリガンドの機序の解明の端についたばかりである。この機序を明らかにするには、蛋白質的（免疫化学的）解析、あるいはFasとFasリガンドの結合作用を阻害する中和抗体等の取得が必須となってくる。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを提供することにある。

また、本発明の目的は、FasリガンドとFasとの生理的反応を抑制（阻害）することができるFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を提供することにある。

さらに、本発明の目的は、該モノクローナル抗体の重鎖（H鎖）及び軽鎖（L鎖）の可変領域及び超可変領域のアミノ酸配列、及びそれをコードするDNAの塩基配列を決定することにある。

【0012】

本発明の他の目的は、溶液中のFasリガンドを検出する方法、及びFasリガンド検出用キットを提供することにある。

本発明者らは、Fasリガンドに対するモノクローナル抗体を作製すれば、Fasシステムの解析が進むのではないかと考え、銳意検討を重ねた結果、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、及び該抗体を產生するハイブリドーマの取得に成功した。

さらに、Fasリガンドに特異的に反応する抗体等に関する研究を進め、その研究結果に基づいて、本発明を完成するに至った。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントが提供される。

また、本発明によれば、前記モノクローナル抗体の超可変領域及び可変領域のアミノ酸配列、及びそれをコードするDNAまたはRNAの塩基配列が提供される。

【0014】

さらに、本発明によれば、(1)動物を、Fasリガンド分子またはFasリガンドを発現させた細胞で免疫感作する、(2)この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、(3)該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、(4)融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する、(5)ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、(6)所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする、(7)所望の抗体を分泌しているクローニングを選択する、(8)再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローニングを樹立する、(9)このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含むことを特徴とするFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0015】

また、本発明によれば、上記工程において、機能的なFas分子を発現していない動物(ヒトを除く)に、FasリガンドまたはFasリガンド発現細胞を免疫感作してFasリガンドに対するモノクローナル抗体を得る方法、及び該方法により得られたFasリガンドに対するモノクローナル抗体が提供される。

本発明によれば、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、Fasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、溶液中のFasリガンドを検出する方法、及びFasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせてなるFasリガンド検出用キットが提供される。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳述する。

Fasリガンド(FasL)は、細胞死(アポトーシス)を媒介する細胞表面蛋白質であるFas抗原(単に、Fasということがある)のリガンドである。Fasリガンドは、その遺伝子の同定結果によれば、278個のアミノ酸からなる分子量31,138の蛋白質であることが判明している。現在までにヒト、ラット、及びマウスのFasリガンドが同定されている。本発明では、広くFasリガンドを対象とするが、これらの中でも、特に、種がヒト及びマウスのFasリガンドが好ましい。すなわち、本発明は、好ましくは、ヒトFas抗原のリガンド及びマウスFas抗原のリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその活性フラグメントに関する。

【0017】

本発明のモノクローナル抗体は、Fasリガンドに特異的に反応するものであれば特に限定されないが、FasリガンドとFasとの生理的反応を阻害(抑制)することができるものであることが好ましい。ここでいう生理的反応を阻害する抗体とは、Fasリガンドを発現している細胞が、Fasを発現している細胞に結合して、Fasを発現している細胞をアポトーシスにより死滅させるシグナルを与える時に、Fasと結合するFasリガンドの結合部位に対し、特異的に結合し、FasリガンドがFasと結合できなくなるようにできる抗体(中和抗体)をさす。すなわち、FasリガンドとFasとの生理的反応を阻害するモノクローナル抗体が存在すれば、Fasリガンドを発現している細胞がFasを発現している細胞を死滅させることができなくなる。

【0018】

しかも、FasリガンドとFasとの結合力よりも強い結合力を持つ抗体であることがより好ましい。具体的には、FasとIgGのFcとを結合させたキメラ分子(Fas-Ig)を指標に調べることができる。このFas-Igは、生体内のFasリガンドとFasとの結合力と同じ結合力でFasリガンドに結合することができる。したがって、Fasリガントに対する抗体が、Fas-Igキメラ分子よりも低濃度でFasリガンドとFasとの結合を阻害することができれば、実際、実用レベルでは生体内種々のFasリガンドによる作用を有効に阻害することができる。

## 【0019】

本発明のFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044(ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045(ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046(ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047(ハイブリドーマNOK4)、及びFERM BP-5048(ハイブリドーマNOK5)として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から產生される各モノクローナル抗体(NOK1~5)を挙げることができる。

また、本発明のFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば、クラスまたはサブクラスが、それぞれマウスIgG<sub>1</sub>、マウスIgG<sub>2a</sub>、マウスIgM、マウスIgG<sub>3</sub>などのものが挙げられる。

## 【0020】

本発明の抗体は、免疫化学的な研究のみならず、免疫治療や診断などに有用である。このような目的を達成するには、必ずしも抗体分子全体を用いる必要がなく、活性を有する限り、分子の一部を用いることができ、場合によってはその方が好ましいこともある。このことは、当業者であれば容易に理解できることである。従って、本発明は、抗Fasリガンド抗体の活性フラグメントをも包含するものである。抗体は、特定の抗原物質を認識する均一な免疫グロブリンである。活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味し、具体的には、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体などを挙げることができる。

## 【0021】

$F(ab')$  2フラグメントは、免疫グロブリン IgGをペプシンを用いて消化することにより得られるフラグメントの1つである。IgGをpH4.0付近でペプシン消化(pepsin digestion)すると、H鎖のヒンジ部で切断されて、分子量約10万のフラグメントを生成する。この切断は、H鎖間のジスルフィド結合よりもC末端側で起こる。このフラグメントは、抗原結合部位が2個あるので、抗原に結合して、沈降反応や凝集反応を起こすことができる。 $Fab'$  フラグメントは、 $F(ab')_2$  フラグメントを2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると、H鎖間のジスルフィド結合が切断されて生じる分子量約5万のフラグメントである。

## 【0022】

$Fab$  フラグメント(antigen-binding fragment)は、IgGをパパイン消化(papain digestion)することにより得られるフラグメントの1つである。IgGをシステインの存在下にパパイン消化すると、ヒンジ部のH鎖間のジスルフィド結合よりN末端側の位置でH鎖を切断し、2個のFabと1個のFc(crystallizable fragment)を生成する。Fab フラグメントは、H鎖のH末端側の約半分に相当するFd フラグメント( $V_H$ ドメイン+ $C_H1$ ドメイン)とL鎖がジスルフィド結合した分子量約45,000のフラグメントである。Fab フラグメントは、抗原結合部位を1個有している。Fv フラグメントは、非共役結合で結合したH鎖可変部( $V_H$ )とL鎖可変部( $V_L$ )からなる抗原結合可能なフラグメントである。

## 【0023】

組換えFv体は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからDNAをシーケンスして、 $V_H$ とL $_H$ をコードする各塩基配列を決定し、次いで、これらのDNA断片をベクターに組み込んで、 $V_L - L\text{inker} - V_H$ の構造を有する一価の抗体活性フラグメントを產生させることにより得ることができる。IgG、Fabまたは $F(ab')_2$ では、 $V_H$ とL $_H$ は、S-S結合により結合しているが、組換えFv体フラグメントでは、VHとLHとの間にリンカーを挿入して、

S-S結合している状態と同様の立体構造がとれるようにしている。このフラグメントは、単にFvと呼ばれることがあり、また、SCFv (single chain Fv) とも呼ばれている。組換えFv体は、大腸菌等の微生物やバクテリオファージによって発現させることもできる。

## 【0024】

これらの活性フラグメントは、単独でも用いられるが、必要に応じて、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質と結合させ、新たな複合物として用いることができる。このような複合物は、一般に、生体内では、長時間分解されずにその効果を最大限まで發揮することが多い。活性フラグメントに、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質を付加する方法は、例えば、Antibodies, A. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されている。一般的には、SPDP(ファルマシア製)等の2価反応性試薬を用いれば、活性フラグメントをアルブミン等と容易に結合させることができる。

また、例えば、マウス由来の活性フラグメントを用いて、H鎖とL鎖におけるFasリガンドと反応するのに必要な領域(例えば、超可変領域)以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置き換えるなどの方法により、ヒト化抗体を得ることもできる。

## 【0025】

本発明のモノクローナル抗体、及び該抗体を產生するハイブリドーマは、例えば、以下の方法により製造することができる。

(1) 動物(例、マウスなどの齧歯類動物)であって、機能的なFas分子を発現していないものを、Fasリガンド分子またはFasリガンドを発現させた細胞(例、COS細胞)で免疫感作する。

(2) この免疫感作した動物から抗体產生細胞を調製して、その懸濁液を形成する。主として、脾臓細胞やリンパ節細胞を用いるが、末梢リンパ球を用いてよい。脾臓細胞を使用する場合には、この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(3) 該抗体產生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する。

例えば、該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤（例、ポリエチレングリコール）の存在下で混合して両細胞を融合する。電気的処理により細胞融合させることもできる。ここで用いるミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なものの（例、8-アザグアニン耐性株）を用いる。

## 【0026】

(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地中で培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別する。選択培地としては、例えば、8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞を用いた場合には、一般に、HAT培地（ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地）を用いる。

(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させた細胞（例、COS細胞）の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する。

## 【0027】

(6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする。クローニングは、通常、限界希釈法により行う。

(7) 所望の抗体を分泌しているクローンを選択する。

(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する。

(9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス（例、ヌードマウス）腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する。

## 【0028】

より具体的に、本発明のモノクローナル抗体、及び該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、以下の方法により製造することができる。

## (1) Fasリガンド発現COS細胞の調製

ヒトFasリガンドの遺伝子は、S. NagataらのInt. Immuno 1. Vol. 6, No. 10, p. 1567-1574に記載の配列を参考にして取得することができる。具体的には、FasリガンドcDNAの5'末端側と3'末端側について相補的な各DNAプライマーを合成し、これらのプライマーとともに、ヒトキラーT細胞から調製したFasリガンドを含むcDNAを鑄型にして、PCR法によりFasリガンド遺伝子の増幅反応を行った後、得られたcDNAをベクターPMKittNeoに導入した。このFasリガンド遺伝子導入ベクターをDEAE-デキストラン法にてCOS細胞(ATCC CRL 1650)に導入(トランスフェクション)し、ヒトFasリガンド発現COS細胞を調製した。

## 【0029】

## (2) 免疫感作

Fasリガンドを発現しているCOS細胞を抗原として、齧歯類動物(例、MPL 1pr/1prマウス)に免疫感作する。MPL 1pr/1prを用いる理由としては、マウスをはじめとする齧歯類動物には、多くの組織でFasの発現がみられることを挙げることができる。そのため、マウスなどをFasリガンドを発現している細胞免疫原(=抗原)として免疫感作すれば、Fasを介した死のシグナルが入り、動物個体を死に至らしめる結果となり、不都合である。MPL 1pr/1prは、長田博士らの報告(Nature, Vol. 356 p. 314-317, 1992)より明らかなように、機能を持ったFasを発現していない、そのため、MPL 1pr/1prマウスに、Fasリガンドを持つ細胞を接種しても死ぬことはなく、十分な免疫感作が可能となる。

## 【0030】

この他には、CBA/1pr<sup>cg</sup>マウスがある。このマウスは、Fas抗原の発現は正常であるが、Fas抗原遺伝子の細胞内領域に点突然変異(point mutation)があり、そのためFasを介したアポトーシスシグナルの伝達異常が起きているマウスである。もちろん、この他にも人工的にFasを欠損したマウスを作ることも、現在の分子生物学の技術を持ってすれば、当業者なら

ば可能である。

以上述べた種々マウスは、今回作製した Fas リガンドに対する抗体を得るためにマウスとして適している。なお、今回の実験では、MRL 1pr/1pr マウスを用いた。

【0031】

(3) この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を取り出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(4) 免疫感作したマウスの脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合促進剤（例、ポリエチレングリコール）の存在下で混合して両細胞を融合する。ミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なものの（例、8-アザグアニン耐性株）を用いる。

(5) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釀して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地（例、HAT 培地）中で培養することにより、目的とするモノクローナル抗体を產生する細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選択培養する。

【0032】

(6) ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、Fas リガンドを発現させた COS 細胞の上清中に存在する Fas リガンドによる Fas 発現細胞への攻撃を阻害すること、すなわち、キラー活性をブロックすることを指標にして、抗体の存在を確認する。具体的には、ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、先ず、Fas リガンドと反応させる。次いで、ターゲットとして Fas 抗原を細胞表面に発現するトランスフェクタントを用い、Fas リガンドのキラー活性をブロックするか否かを調べ、キラー活性をブロックした培養上清のハイブリドーマを選択する方法がある。

(7) 所望の抗体を產生するハイブリドーマを選択した後、限界希釀法により单一クローンにする。

(8) その单一クローンの培養上清液からモノクローナル抗体を回収する。

【0033】

本発明のモノクローナル抗体は、Fasリガンドに特異的に反応する抗体である。Fasリガンドの種は、ヒトまたはマウスであることが好ましい。後述の実施例では、ヒトFasリガンドの遺伝子を用いて、遺伝子工学的手法によりFasリガンド発現COS細胞を調製し、マウス起源のモノクローナル抗体を得ている。

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5044（ハイブリドーマNOK1）、FERM BP-5045（ハイブリドーマNOK2）、FERM BP-5046（ハイブリドーマNOK3）、FERM BP-5047（ハイブリドーマNOK4）、及びFERM BP-5048（ハイブリドーマNOK5）として寄託されているハイブリドーマ細胞株のいずれか1つから產生されるモノクローナル抗体である。

#### 【0034】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトFasリガンドに特異的に反応するものであることが好ましい。また、本発明のモノクローナル抗体は、サルFasリガンドとも反応するものであることが好ましい。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトまたはサルのFasリガンドとFasとの生理的反応を抑制（阻害）することができるものであることが好ましい。しかし、マウスFasリガンドとFasとの生理的反応は抑制しないものであることが好ましい。FasリガンドとFasとの生理反応の抑制の代表例は、Fasリガンド発現細胞が分泌する可溶性Fasリガンドにより引き起こされるFas発現細胞のアポトーシスの抑制である。

#### 【0035】

本発明のモノクローナル抗体は、可溶性FasリガンドがFas発現細胞に対して引き起こすアポトーシスを90%以上のアポトーシス抑制率で抑制することができる。ここで、アポトーシス抑制率とは、Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釀液中に中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、一方、Fasを遺伝子導入した細胞をターゲット細胞とし、両者を96ウェルプレート中で100μlの反応系で反応させ、ターゲット細胞の16時間後の生存率を生細胞数検出試薬を用いて測定する細胞障害反応試験にお

いて、抗体を添加したときのターゲット細胞の生存率を意味する。

#### 【0036】

モノクローナル抗体が前記ハイブリドーマNOK1ないしNOK5のいずれか1つのハイブリドーマが產生するモノクローナル抗体である場合、Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釀液中に中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、その希釀液 $25\mu l$ を用い、一方、Fasを遺伝子導入した細胞（Fas／WR19L）をターゲット細胞とし、該細胞の濃度 $2 \times 10^5 / ml$ 液 $50\mu l$ を用い、そして、前記モノクローナル抗体を含むハイブリドーマの培養上清 $25\mu l$ を用い、これらのすべてを混合した後、37°Cで16時間反応させたとき、ターゲット細胞の生存率（すなわち、アポトーシス抑制率）を90%以上とすることができる。

#### 【0037】

本発明のモノクローナル抗体のアポトーシスの抑制活性は、Fas-Igキメラ分子よりも高いものである。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、Fas-Igキメラ分子に比べて、Fasリガンドに対する抗体濃度が20倍低濃度でも、高いアポトーシスの抑制活性を示す。

本発明のモノクローナル抗体は、Fasリガンド発現細胞の培養上清中に存在する可溶性Fasリガンドをアフィニティー精製することができる。また、本発明のモノクローナル抗体は、Fasリガンド発現細胞上のFasリガンド分子あるいは培養液中に分泌された可溶性Fasリガンド分子を免疫沈降することができる。

#### 【0038】

本発明のモノクローナル抗体は、Fasリガンドと特異的に反応するため、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構やFasシステムを解明するのに役立つことができる。また、本発明のモノクローナル抗体及びその活性フラグメントは、免疫治療や診断、及びこれらに関連した産業分野において有用である。例えば、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を血液中の細胞と反応させ、蛍光標識の2次抗体をさらに結合させ、フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡で測定すれば、Fasリガンドがどの細胞に発現しているかを見極

めることができる。本発明のモノクローナル抗体を FITC や PE などの蛍光色素に結合させることは、常法により容易に行うことができる。したがって、本発明のモノクローナル抗体及びその活性フラグメントは、例えば、診断用の試薬として有用である。

種々の疾患（例えば、自己免疫疾患、リューマチ、肝炎など）の患者から取り出した組織等に対し、本発明のモノクローナル抗体を反応させることにより、 Fas リガンドを発現している細胞が組織のどこに存在しているのかを調べることができます。

#### 【0039】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトの細胞表面上の Fas リガンドあるいは可溶性 Fas リガンドを認識（反応）し、かつ、サルの細胞表面上の Fas リガンドをも認識することができるので、エイズやウイルス性肝炎等をはじめとする各種疾患に対する治療用抗体の検討に有用であるとともに、新しい治療薬のスクリーニングにおいて効果をモニターできるので、非常に有用である。

本発明のモノクローナル抗体は、 Fas リガンドと Fas との生理的反応を抑制（阻害）する点において、ヒトの Fas リガンドの生理的反応は阻害できるが、マウスの Fas リガンドの生理的反応は阻害できないので、 SCID マウス等での検討に有用である。さらに、ヒトの細胞をマウスに移植した後の作用等を特異的に阻害させたり、モニターするのにも有用である。

#### 【0040】

本発明のモノクローナル抗体を複数（例えば、2種類）組み合わせて用いることにより、溶液（血液、培養上清液、体液、尿液など）中の Fas リガンドを検出（さらには定量）することができる。複数のモノクローナル抗体のうち、一種のモノクローナル抗体を担体に固定し、他種のモノクローナル抗体を標識化合物で標識し、そして、モノクローナル抗体を固定した担体を Fas リガンドを含むと思われる検体の溶液に浸漬して検体を吸着させ、吸着した検体を標識化合物で標識したモノクローナル抗体により検出する検出方法が好ましい。なお、担体としては、 ELISA プレートが好ましい。

#### 【0041】

より具体的には、IgMタイプの精製したモノクローナル抗体をプレートに固定し、IgGタイプのビオチン標識したモノクローナル抗体により、溶液中のFasリガンドを検出する方法を挙げることができる。例えば、IgMタイプの精製したFasリガンドに対する抗体をプレートに固定し、ビオチン標識したIgGタイプのFasリガンドに対する抗体で検出するという方法で、溶液中のFasリガンド分子は、濃度が1ng/ml以上のものを検出することができる。

#### 【0042】

さらに詳細には、例えば、IgMタイプであるNOK3抗体の精製抗体をPBS（リン酸緩衝生理食塩水）で $10\mu g/ml$ 溶液に調製したものを、ELISAプレートに $50\mu l/well$ 入れて、プレート底部に固定し、測定したい可溶性Fasリガンドを含むと思われる検体（サンプル）を適当な濃度にPBSあるいは10%FCS・RPMI1640培養液で希釈し、このサンプルをIgMタイプのNOK3抗体で固定したプレートに吸着し、吸着したサンプル中の可溶性Fasリガンドを、別の抗体であるビオチン等で標識したNOK1抗体で検出する検出方法がある。

#### 【0043】

この検出方法では、①1つ目の抗体を固相（例えば、プレート）に固定する、②抗体が吸着しなかった残りの部分をブロッキング剤でブロックする、③測定したいサンプルを入れ、抗体に吸着させ、残りを洗い流した後、④2つ目の抗体には、適当な物質で標識しておき、この抗体をさらに反応させて、「抗体－測定したい物質（Fasリガンド）－標識した抗体」のコンプレックス（複合体）を固相上に形成し、⑤標識物質を指標に、標識物質と結合する蛍光物質や吸光物質を入れて、最終的にその蛍光強度または吸光強度を測定する。

#### 【0044】

このとき、Fasリガンド分子のスタンダードが必要であるが、これは今回得られたFasリガンドに対するモノクローナル抗体を用いて精製することができる。すなわち、ヒトFasリガンドの遺伝子を導入したL5178Y（マウスT細胞株；ATTCから入手可能）である遺伝子導入細胞hFasL/L5178Yを無血清培地で大量に培養する。この細胞培養液から培養上清を回収（遠心分

離により細胞を除去)し、分離膜等を用いて濃縮する。この濃縮した液をもとに精製を行う。精製は、F a s リガンドに対するモノクローナル抗体をセファロースのビーズに固定したアフィニティーカラムを用いて行うとよい。アフィニティーカラムは、C N B r (臭化プロニウム)で活性化したセファロースビーズにF a s リガンドに対する抗体を結合させることにより作ることができる。このようにしてh F a s L/L 5 1 7 8 Yの1リットルの培養上清から2~3 μ gの可溶性のF a s リガンドが得られる。

また、複数(例えば、2種類)のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、F a s リガンド検出用キットを得ることができる。本発明の可溶性F a s リガンドを検出するキットとしては、例えば、以下の構成のものが挙げられる。

## 【0045】

【表1】

① 96 ウエル・マイクロプレート	1枚
②ビオチン化NOK1抗体(5 μg/ml)	5 ml
③NOK3抗体(10 μg/ml)	5 ml
④ブロッキング液(1/2希釈ブロックエース)	20 ml
⑤AB complex液	A液 2.5 ml B液 2.5 ml
⑥基質液	10 ml
⑦反応停止液	10 ml

## 【0046】

もちろん、抗体を96 ウエル・プレートに固定した状態で提供することもできるし、抗体を固定したビーズを用いこのビーズを小試験管に入れて、反応を行う形態も容易にとることができる。

このようなF a s リガンド検出用キットにより、F a s リガンド分子の濃度が少なくとも0.4325 ng/mlである溶液中のF a s リガンドを検出することができる。また、本発明のキットにより、例えば、伝染性単核球症(I M)、全身性エリテマトーデス(S L E)、肝炎(H e p a t i t i s)などに罹患し

たヒトの血液中の Fas リガンドの濃度を検出することができる。したがって、血液中の Fas リガンドの濃度が健常人に比べて有意に高いことを指標にして、これらの疾患の診断を行うことができる。

## 【0047】

本発明者らは、ヒト Fas リガンドに対するモノクローナル抗体（抗 FasL モノクローナル抗体）の重鎖（Heavy Chain）及び軽鎖（Light Chain）の可変部領域のアミノ酸配列及びそれらをコードする DNA の塩基配列を決定した。すなわち、抗 FasL モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ（例、ハイブリドーマ NOK1～5）から cDNA を抽出し、それから PCR 法及びミニゲル（mini gel）電気泳動法により、重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）及び軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）をコードする DNA を回収した。該 DNA を導入した形質転換体を培養した後、プラスミド DNA を Dye-terminator 法により DNA シーケンスし、塩基配列を決定した。

また、該塩基配列からそれがコードするアミノ酸配列を求め、抗 FasL モノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を決定した。さらに、該アミノ酸配列について詳細に検討し、それぞれの超可変領域（CDR1～3）のアミノ酸配列を決定した。これらの配列は、後記の配列表に示した。

## 【0048】

モノクローナル抗体が抗原を認識する部位を可変領域という。その中で、抗原と結合する部位を超可変領域（CDR）という。可変領域には、超可変領域が 3 か所含まれる。超可変領域を保存し、可変領域の他の部分を立体構造をうまく保ち、かつ、他の種のものにより近くなるように替えてやることで、その種に応じた抗体が得られる。例えば、後述の実施例では、マウスの抗体が得られているが、この超可変領域を保存し、可変領域の他の部分をできるだけヒトのものに近いものに替え、かつ、Fc 部分をヒトのものに替えることで、ヒト型化抗体を得ることができる。最近では、HAM A の問題があり、単なるキメラ抗体（可変領域保存）にしたものから、超可変領域のみを保存した抗体に、治療用抗体が移りつつある。

## 【0049】

抗FasLモノクローナル抗体)のH鎖及びL鎖の可変部領域のアミノ酸配列及びそれらをコードするDNAの塩基配列の決定により、以下のようなモノクローナル抗体またはその活性フラグメントが提供される。

1. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列の①30番目のSerから34番目のAsn、②49番目のArgから65番目のGly、及び③93番目のTyrから109番目のTyrであり、(3)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列の①24番目のArgから34番目のAsn、②50番目のTyrから56番目のSer、及び③89番目のGlnから97番目のThrであるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0050】

2. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5045として寄託されているハイブリドーマNOK2が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列の①30番目のAsnから34番目のGly、②49番目のTyrから65番目のGly、及び③93番目のTyrから107番目のTyrであり、(3)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列の①24番目のLysから39番目のGly、②55番目のLeuから61番目のSer、及び③95番目のGlnから102番目のThrであるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0051】

3. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5046として寄託されているハイブリドーマNOK3が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列の①30

番目のS e rから34番目のA s n、②49番目のA r gから65番目のG l y、及び③93番目のT y rから105番目のV a 1であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0052】

4. ヒトF a sリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 7として寄託されているハイブリドーマN O K 4が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列の①32番目のT y rから35番目のA s n、②50番目のT y rから65番目のA s n、及び③93番目のT y rから107番目のT y rであり、(3) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列の①24番目のA r gから38番目のH i s、②54番目のA r gから60番目のS e r、及び③93番目のG l nから101番目のT h rであるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0053】

5. ヒトF a sリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 8として寄託されているハイブリドーマN O K 5が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列の①30番目のT h rから34番目のH i s、②49番目のT y rから65番目のA s p、及び③93番目のT y rから106番目のT y rであり、(3) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列の①24番目のL y sから34番目のA l a、②50番目のT y rから56番目のT h r、及び③89番目のG l nから97番目のT h rであるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0054】

6. ヒトF a sリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 4として寄託されているハイブリドーマN O K 1が產生する抗体と同等であり、

(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列であり、(3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0055】

7. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 5として寄託されているハイブリドーマNOK2が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列であり、(3)L鎖の可変領域が配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0056】

8. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 6として寄託されているハイブリドーマNOK3が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0057】

9. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 7として寄託されているハイブリドーマNOK4が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、(3)L鎖の可変領域が配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0058】

10. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 8として寄託されているハイブリドーマNOK5が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列であり、(3)L鎖の可変領域が配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列である

モノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

【0059】

また、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、前記1～5のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の超可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNAが提供される。

さらに、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、前記6～10のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNAが提供される。

【0060】

【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例のみに限定されるものではない。

【0061】

【実施例1】 モノクローナル抗体の作製及び特性化

(1) Fasリガンド遺伝子の単離

①プライマーの調製

ヒトFasリガンドの遺伝子は、Nagata et al. の報告をもとに単離した。すなわち、ヒトFasリガンドcDNAの5'末端側では、Xho-Iサイトの配列にヒトFasリガンド5'末端の配列18merを付加したXho-I-5' FasL、ヒトFasリガンドcDNAの3'末端側では、Not1サイトの配列にヒトFasリガンド3'末端の配列18merを付加したNot1-3' FasLのそれぞれについて、モデル392DNA/RNAシンセサイザー(ABI製)を用いて0.2μmolのスケールでDNA合成を行った。プロトコールに従い生成DNAを精製して、PCR用のプライマーとした。

【0062】

②FasリガンドcDNAの鑄型の調製

鑄型は、ヒトFasリガンドを発現しているヒトキラーT細胞から調製した。具体的には、ヒトキラーT細胞をPMAとイオノマイシンで活性化し、この細胞を $1 \times 10^7$ 個回収した。回収した細胞は、RNazolB(コスモバイオ製)

1 ml に懸濁し、さらに 100 μl のクロロホルムを加えてよく混合した後、氷上にて 30 分間放置した。その後、15,000 rpm、15 分間の遠心分離（4°C）にて、フェノール層と水層とに分け、上層の水層のみを回収した。これに對して等量のイソプロパノールを加え、-80°C にて 30 分間放置し、遠心分離（15,000 rpm、15 分間、4°C）で RNA を沈殿させた。この沈殿をエタノール 1 ml で 1 回遠心洗浄した後、DEPC 処理した水 1.5 μl に懸濁した。この RNA 液 1.5 μl に対し、合成のオリゴ dT を 0.5 μl (0.5 mg/ml) 加え、70°C にて 10 分間熱処理を行った。その後、氷上にて 5 分間処理した。

## 【0063】

その後、5 × RT 緩衝液（ストラタジーン製）4 μl と 10 mM の dNTP 1 μl と 0.1 MDTT 2 μl と Superscript RTase（ストラタジーン製）1 μl とを加え、42°C で 50 分間反応させ、cDNA へと逆転写させた。90°C で 5 分間処理し、RTase を失活させた後、氷上に 5 分間放置した。次に、このサンプルに RNase H（ストラタジーン製）1 μl を加え、さらに 37°C で 20 分間反応させて不要な RNA を分解した後、これを Fas リガンドを含む cDNA の鑄型とした。

## 【0064】

## ③PCR

PCR は、PCR 実験マニュアル (HB J 出版、p. 75~85) を参考に、次の条件で実施した。

すなわち、②で作製した cDNA 2 μl に対し、10 mM の dNTP mix (ファルマシア製) 1 μl + Xho I サイト -5' ヒト FasL 18mer (50 μM) 1 μl + Not I -3' ヒト FasL 18mer (50 μM) 1 μl + 10 × の PCR 緩衝液 (パーキンエルマー製) 4 μl + AmpliTaqTM (パーキンエルマー製) 0.5 μl + 水 30.5 μl でトータル 40 μl にし、これにミネラルオイル (シグマ製) 40 μl を重層した後、PCR 用の DNA サーマルサイクラー (パーキンエルマージャパン製) を用いて増幅反応を行った。具体的には、順次、94°C 5 分間、55°C 2 分間、72°C 3 分間、94°C 1 分間、5

5℃2分間、及び72℃10分間の条件で、かつ、55℃2分間と94℃1分間との間の処理を30回繰り返すことにより増幅反応を行った。

## 【0065】

④ PMK i t N e o ベクターへの組み込み

PCRにて増幅反応を行った後、フェノールとクロロホルムの混合液で水層のみを抽出した。この液に、Xho IとNot I（いずれもベンリンガー社製）各1.0単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて16時間反応した。この液について、1%アガロースゲル電気泳動を行った。UV照射のもとで、Fasリガンドに相当する約850bpのバンドを切り出した。

このアガロースゲルから、GENE CLEAN IIキット（BIO101、フナコシ製）を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスミルク（glass milk）を加え5分間ローテートし、DNAを吸着させた。このグラスミルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液10μlに懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。

## 【0066】

次に、PMK i t N e o ベクターも1μg分、同様に、Xho IとNot Iで制限酵素処理を行い、0.75%アガロース電気泳動した後、GENE CLEAN IIキットを用いて精製した。

次に、FasリガンドcDNAとPMK i t N e o ベクターをライゲーションした。すなわち、ベクター:cDNA=1:2（モル比）になるように混合し、これに宝酒造製のDNAライゲーションキットを用いて、16℃にて16時間ライゲーション反応を行った。

## 【0067】

⑤ 大腸菌への組み込み

前記④の反応液を、大腸菌コンピテントセル（東洋紡製）と混合して、氷上で30分間、42℃で40秒間インキュベートすることにより、DNAを大腸菌へ導入した。これに対し、SOC培地を加え、37℃で1時間振とう培養後、アンピシリン入りのLB寒天培地に分注し37℃にて1日間培養した。その後、出現

したコロニーをL B 培地で37℃1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド（ヒトFasリガンド-PMKittNeo）を回収した。

## 【0068】

(2) COS細胞への導入

プラスミド（ヒトFasリガンド-PMKittNeo）のCOS細胞(ATCC CRL1650)への導入は、DEAE-デキストラン法（実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現解析法、p. 16-22、1994、羊土社）により行った。すなわち、アルマシア製のDEAE-デキストランを用い、ヒトFasリガンド-PMKittNeo $5\mu g/2\times 10^6$ COS細胞の割合でDEAE-デキストラン法を実施し、Fasリガンド発現COS細胞を得た。

## 【0069】

(3) 免疫感作

前記(2)で調製したFasリガンド発現COS細胞の懸濁液をMPL 1pr/1prマウス（メス、4週齢）の腹腔内に、 $1\times 10^7$ 個（細胞）/匹の割合で注射した。次いで、1週間後から週1回の割合で合計3回、同一マウスにFasリガンド発現COS細胞の懸濁液を注射することにより、免疫感作した。

## 【0070】

(4) 細胞融合

最終免疫の3日後に、上記マウスから脾臓を取り出した。脾臓を細断後、メッシュで濾過し、RPMI1640培地（日本製）に浮遊させ、脾細胞 $1\times 10^8$ 個を得た。この脾細胞とマウス由来の8-アザグアニン耐性株（ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株）P3X63Ag8.653(ATCC CRL1580) ( $1\times 10^7$ 個)と約5:1の割合で混合し、遠心した(1500rpm、5分間)。

得られた細胞のペレットに、50%ポリエチレンギリコール4000（メルク製）/RPMI1640溶液2mlを、37℃の温水中で攪拌しながら1分間を要して加えた。これにRPMI1640液15mlを攪拌しながら6分間を要して加え、細胞融合を行った。融合後、大量（約40ml）のRPMI1640

液を加え、遠心分離（1500 rpm、5分）して上清を除去した。次いで、ヒポキサンチン（100 μM）、アミノブテリン（0.4 μM）、チミジン（10 μM）を含む10%FCS（牛胎児血清）- RPMI 1640培地（HAT培地）にて、脾細胞が $1 \times 10^6$ 個/mlになるように調製した。

## 【0071】

(5) ハイブリドーマの選択

上記（4）で調製した細胞浮遊液を96ウェルマイクロプレート10枚に200 μlずつ分注し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下にあるCO<sub>2</sub>インキュベータで細胞を培養した。1週間後には、ハイブリドーマのみがコロニーを形成して、増殖していくことが確認できた。

## 【0072】

(6) ハイブリドーマの選別

エフェクター分子として、Fasリガンドを発現したCOS細胞の培養上清を使用し、かつ、ターゲットとしてFas抗原を細胞表面に発現するトランスクタントを用い、COSの培養上清中に存在する可溶性Fasリガンド分子のトランスクタントに対するキラー活性をブロックした培養上清のハイブリドーマを選別した。

①可溶性Fasリガンド分子の調製

Fasリガンド分子は、Fasリガンド発現COS細胞の培養上清に存在する可溶性Fasリガンド分子を使用した。すなわちCOS細胞にDEAE-デキストラノン法にてFasリガンド-PMKITN<sub>eo</sub>を導入後、10%FCS-DMEM培地100ml分用いて1週間培養した後、その培養上清を回収した。これを0.45 μmのフィルターで滅菌し、これを可溶性Fasリガンド分子とした。

## 【0073】

②ターゲット細胞の調製

ターゲット細胞には、ヒトFas遺伝子を導入したWR19L細胞を用いた。WR19L(ATCC TIB52)へのヒトFas遺伝子の導入は、常法に従って行った。具体的には、Hanabuchiらの文献(Proc. Natl Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4933)

4, 1994) を参考にして作製した。得られた Fas-WR19L 細胞を培養し、10% FCS・RPMI 培地にて  $2 \times 10^5$  個/ml に調製した。

## 【0074】

(3) スクリーニングアッセイ

先ず、①で調製した可溶性 Fas リガンド分子を 10% FCS-DME 培地で 12 倍に希釈した。96 ウエル平底プレート（コーニング製）を用い、各ウエルに、この希釈液 25 μl に対し、各ハイブリドーマの培養上清を 25 μl 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。この後、②で調製した Fas-WR19L 細胞を 50 μl / ウエル加え、37°C で 5% CO<sub>2</sub> の環境下のもと、12 時間インキュベートした。

次いで、Alamar Blue TM アッセイキット（関東化学）を用いて生細胞率を測定し、可溶性 Fas リガンド分子による Fas-WR19L 細胞に対するキラー活性を阻害しているウエルのハイブリドーマを選択した。

## 【0075】

(7) クローニング

抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を、限界希釈法により 1 個 / ウエルとなるように、96 ウエルマイクロプレートに分注し、培養した。10 日間の培養後、シングルコロニーの増殖が確認できたため、再び、キラー活性のブロックによる抗体検出の操作を行った。その結果、Fas リガンドと特異的に反応するクローナーを得た。次いで、単一クローナーのハイブリドーマの培養上清液から抗体を回収することにより、目的とする Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。

上記で得られたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、NOK と命名されて、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 (NOK1)、FERM BP-5045 (NOK2)、FERM BP-5046 (NOK3)、FERM BP-5047 (NOK4)、FERM BP-5048 (NOK5) などとして寄託されている細胞株を例示することができる。

## 【0076】

(8) モノクローナル抗体の特性化

特性化① (FasL発現細胞の染色)

得られたハイブリドーマの中で例えばNOK5の細胞株が産生する抗体が、細胞表面に発現するFasリガンドと反応することを、Fasリガンドを発現させたL5178Y細胞をもともとの親株であるL5178Y細胞(ATCC CR L1723)と比較することで検討した。

ヒトFasリガンド遺伝子をL5178Yに導入する方法(FasL-L5178Tの調製法)は、以下の通りである。

すなわち、PMKit Neoに組み込んだヒトFasリガンド遺伝子 $1\mu g$ に対し、XhoIとNotI(ベーリンガー製)の制限酵素を各1単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて2時間反応させた。この液について、1%アガロースゲル電気泳動を行った。UV照射のもとでFasリガンドに相当する約850bpのバンドを切り出した。

【0077】

このアガロースゲルから、GENE CLEAN IIキット(BIO101、フナコシ製)を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスマルク(glass milk)を加え5分間ローテートし、DNAを吸着させた。このグラスマルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液 $10\mu l$ に懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。次に、BCMG S<sub>neo</sub>のベクター $1\mu g$ についても同様にXhoIとNotIで制限酵素処理を行い、0.75%アガロースゲル電気泳動を行った後、GENE CLEAN IIキットを用いて精製した。

【0078】

次に、FasリガンドcDNAとBCMG S<sub>neo</sub>ベクターのライゲーションをベクター:cDNA=1:2(モル比)になるように混合し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて、16℃で16時間反応させて行った。

この反応液を、大腸菌コンピテンスセル(東洋紡製)と混合して、氷上で30分間、42℃で40秒間インキュベートすることにより、DNAを大腸菌へ導入

した。これに対し、S O C 培地を加え、37℃で1時間振盪培養後、アンビシリコン入りのL B 寒天培地に分注し37℃にて1日間培養した。その後、出現したコロニーをL B 培地で37℃1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド（ヒトF a s リガンド-BCMGS<sub>neo</sub>）を回収した。

## 【0079】

このヒトF a s リガンド-BCMGS<sub>neo</sub> 1 μgについて、L 5 1 7 8 Y細胞  $1 \times 10^6$ 個に対し、エレクトロポレーション法にて、遺伝子導入を行った。条件は、ジーンパルサー（バイオラッド製）を用い、296V、960μFにて実施した。この細胞を、再度10%F C S · R P M I 1 6 4 0 培地5m lに懸濁した。6ウエルプレートにこの細胞の液を入れて培養を行ったが、このとき、G 4 1 8 (G I B C O 製) を0.4mg/m lになるように培地に添加した。10日の培養後コロニーが得られたので、限界希釀法により細胞をクローニングした。得られたクローンについてノーザンハイブリダイゼーション法によりヒトF a s リガンドのm R N A が一番高いものについて選別し、培養した。これをF a s リガンド-L 5 1 7 8 Y細胞とした。

## 【0080】

L 5 1 7 8 Y細胞及びF a s リガンド-L 5 1 7 8 Y細胞は、それぞれP B S で $1 \times 10^6$ 個/m lに調製した。チューブ（ファルコンNo. 2008）にこの細胞を $1 \times 10^6$ 個ずつ入れた。次いで、ハイブリドーマN O K 5の培養上清 100μlを入れ、氷上で30分間反応させた。次いで、P B Sで遠心洗浄（1500r p m、1分間、2回）し、F I T C-抗マウスI g's (コスモバイオ/カペル製) 1μlを加え、さらに氷上で20分間反応させた。反応後、P B S で2回遠心洗浄を行い、P B S 200μlに懸濁した後、F A C S c a n にて測定した。

## 【0081】

その結果、図1～3に示すように、N O K 5が産生する抗体は、F a s リガンドを発現したL 5 1 7 8 Y細胞には反応するが、親株のL 5 1 7 8 Y細胞には反応しないことが明らかになった。即ち、図2と図3に示すように、親株のL 5 1 7 8 Y細胞の染色パターンは、N O K 5抗体の添加の有無によって相違すること

はないが、図1に示すように、Fasリガンド-L5178Y細胞の染色パターンは、NOK5抗体の添加の有無によって明瞭に相違している。

NOK1ないしNOK4の細胞株を用いて、前記NOK5の場合と同様の結果を得た。

【0082】

特性化②(サブクラスの測定)

NOK1ないしNOK5のハイブリドーマが產生するモノクローナル抗体について、サブクラスを測定した。

サブクラスの測定は、MA B タイピングキット (PharMingen社製) を用い、付属のプロトコールに従い測定したところ、それぞれ、NOK1は、マウスIgG<sub>1</sub>、NOK2は、マウスIgG<sub>2a</sub>、NOK3は、マウスIgM、NOK4は、マウスIgG<sub>3</sub>、NOK5は、マウスIgG<sub>2a</sub>であった。

【0083】

特性化③

前記したとおり、Alamar Blue TMアッセイキット(関東化学)を用いて生細胞率を測定し、可溶性Fasリガンド分子によるFas-WR19L細胞に対するキラー活性を阻害しているウエルのハイブリドーマを選択したが、NOK1～NOK5のハイブリドーマが產生するモノクローナル抗体は、下表に示すごとく、前記(6)①～③に記載の方法で実施すれば、可溶性FasリガンドによるFas-WR19L細胞に対するキラー活性を、90%以上、好ましくは98%以上の高率で阻害する。すなわち、これらの抗体のアポトーシス抑制率は、90%以上、好ましくは98%以上である。

【0084】

【表2】

クローン	生存率
抗体無添加	3. 5%
NOK1培養上清添加	99. 3%
NOK2培養上清添加	105. 2%
NOK3培養上清添加	101. 0%
NOK4培養上清添加	109. 8%
NOK5培養上清添加	98. 2%

## 【0085】

## 〔実施例2〕モノクローナル抗体の特性化

ハイブリドーマNOK1～NOK3が分泌する各モノクローナル抗体の特性について、以下の方法により更に検討した。

## (1) 精製抗体の調製

①ハイブリドーマNOK1～NOK3をそれぞれ10%FCS入りRPMI1640培地で $3 \times 10^7$ 個まで増殖させた。 $3 \times 10^7$ 個の細胞は、 $75 \text{ cm}^2$ フランコ（ファルコン製）に30ml培養液を入れて細胞培養を行うスケールで調製した。具体的には、 $2 \times 10^5$ 個/mlの濃度で培養を始め、 $1 \times 10^6$ 個/mlになるとき細胞を回収した。

②回収したハイブリドーマは、NOK1～NOK3のいずれにおいても1.5mlのPBSに懸濁し、ヌードマウスに対し、0.5ml( $1 \times 10^7$ 個相当分)腹腔内投与した。10日間の飼育の後、腹腔内にたまつた腹水を回収した。

③回収した腹水は、NOK1で6.9ml/匹、NOK2で6.7ml/匹、NOK3で7.4ml/匹であった。このうち、それぞれ10mlを用い精製を行った。

④精製は、それぞれ10ml(等量)の飽和硫酸アンモニウムを滴下し、腹水と混合する硫酸安塩析から始めた。4℃にて2時間攪拌後、10,000gで15分間遠心分離を行った。上澄みを捨てた後、沈殿したものを5mlのPBSにて溶解させた。その後、PBS3リットルにて1昼夜透析した。

## 【0086】

⑤NOK1及びNOK2については、透析サンプルを回収後、Protein Gカラム（ファルマシア製）を用いて、FPLCシステムにてProtein G吸着IgGのみを精製した。このサンプルをさらにPBSにて透析を一昼夜行った。翌日に蛋白質濃度の定量及び純度の検定を行った。NOK3については、透析サンプルを回収後、ゲルろ過用のSuperdex200（ファルマシア製）カラムを用いてFPLCシステムにて、ゲルろ過し、void volumeに出てくるIgMを回収した。この回収したIgMについても、蛋白質の定量及び純度の検討を行った。

蛋白質の定量は、バイオラッド製の蛋白質定量試薬を用いて測定し、純度の検定は、SDS電気泳動を還元条件にて行い調べた。その後、NOK1～NOK3抗体を1mg/mlにPBSにて調製後、0.2μmのフィルターを用いて滅菌した。

#### 【0087】

##### (2) 細胞障害反応

###### ①可溶性Fasリガンド分子の調製

Fasリガンド分子としては、Fasリガンド発現COS細胞の培養上清に存在する可溶性Fasリガンド分子を使用した。すなわち、COS細胞にDEAE-デキストラン法にてFasリガンド-PMKit Neoを導入後、10%FCS-DME培地100ml分用いて1週間培養した後、その培養上清を回収した。これを0.45μmのフィルターで滅菌し、これを可溶性Fasリガンド分子とした。

#### 【0088】

###### ②Fasリガンドに対する抗体の調製

前述のNOK1～NOK3が產生した各抗体に関し、10%FCS-RPMI1640培地で13種類の濃度のものを作製した。抗体の濃度は、それぞれ1.6μg/ml、8μg/ml、4μg/ml、2μg/ml、1μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.125μg/ml、0.0625μg/ml、0.03125μg/ml、0.015625μg/ml、0.0078125μg/ml、0.0039062μg/mlのものを1mlずつ作製し

た。

なお、これらの抗体は、それぞれ $100\mu l$ の反応系に $1/4$ 容量の $25\mu l$ を入れるため、最終的な実効濃度は $1/4$ の濃度となる。

### 【0089】

#### ③ Fas-Igの調製

Fas-Igのつくり方は、本発明者である八木田、奥村らの文献 (Hana buchi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934, 1994) に詳細に述べられている。今回は、これと同じものを用いた。

すなわち、FasのcDNAについて、細胞外ドメインにあたる部分の両端の配列をPCRプライマーとした。このプライマーをもとにFasの細胞外ドメインをPCRにて増幅し、ヒト免疫グロブリンIgGのFcが入ったベクターpBluescript IIにサブクローニングした。その後、このベクターからFas-Igのフラグメントを回収し、CDM8の発現ベクターに組み込んだ。このFas-Ig/CDM8ベクターをCOS細胞に導入して、培養を行い、約10日後、培養上清を回収した。この培養上清をProtein Aセファロースビーズのカラム（ファルマシア製）を用いて精製した。PBSにて透析後 $1mg/ml$ に調製し、 $0.2\mu m$ のフィルターで滅菌した。これについても、10%FCS-RPMI1640で、Fasリガンドに対する抗体NOK1~NOK3と同様に、 $16\mu g/ml$ ~ $0.0039062\mu g/ml$ の範囲内の13種の濃度に調製した。

### 【0090】

#### ④ ターゲット細胞の調製

ターゲット細胞には、ヒトFas遺伝子を導入したWR19L細胞を用いた。WR19L(ATCC TIB52)へのヒトFas遺伝子の導入は、常法に従って行った。具体的には、本発明者である八木田、奥村らの文献であるHana buchiらの文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934, 1994) を参考にして作製した。得られたFas-WR19L細胞を培養し、10%FCS・RPMI培地に

て $2 \times 10^5$ 個/m<sup>1</sup>に調製した。

### 【0091】

#### ⑤細胞障害反応

まず、①で調製した可溶性Fasリガンド分子を10%FCS-DME培地で12倍に希釈した。96ウェル平底プレートを用い、各ウェルにこの希釈液25μlを入れた。次いで、Fasリガンドに対する抗体NOK1～NOK3及びFas-Igのそれぞれの濃度の液を3ウェルずつに25μl/ウェルの割合で加えた。その後、37℃で5%CO<sub>2</sub>のもと1時間インキュベートした。この後、④で調製したFas-WR19L細胞を50μl/ウェル加え、37℃で5%CO<sub>2</sub>のもと12時間インキュベートした。次いで、アラマーブルー(Alamar Blue<sup>TM</sup>、コスモバイオより購入)を1/10vol 10μl入れて、さらに37℃で5%CO<sub>2</sub>のもと4時間インキュベートした。その後、フルオロスキャンII(タイターテック製)蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、蛍光を測定した。

### 【0092】

なお、可溶性Fasリガンドも抗体もFas-Igも入れずに、Fas-WR19L細胞50μl/ウェルに対し、10%FCS-RPMI1640培地50μl/ウェル入れたものを100%生存のコントロールとし、可溶性Fasリガンド25μlに10%Fcs-RPMI1640 25μl、Fas-WR19L 50μl入れたものをアポトーシスのコントロールとした。その結果を図4に示す。

### 【0093】

この図4に示すように、モノクローナル抗体NOK1～NOK3のいずれも、濃度依存的に可溶性Fasリガンドが持つFas発現細胞に対するアポトーシス誘導活性を中和(抑制)することが実証できた。しかも、その抑制効果は、Fas-Igよりも20倍以上低い濃度でも優れていることがわかった。すなわち、本発明のモノクローナル抗体がFas-IgよりもFasに対するアフィニティーが強く、より有効であることが実証できた。

このことは、生体内でもモノクローナル抗体NOK1～NOK3のいずれかが

存在すれば、FasリガンドとFasが結合するよりも、Fasリガンドとこれらのモノクローナル抗体が結合することから、FasとFasリガンドの生理的反応を十分抑制できることが容易に推察される。

## 【0094】

## [実施例3] Fasリガンド分子の免疫沈降

得られたFasリガンドに対するモノクローナル抗体が、Fasリガンド分子を免疫沈降できるか否かを確認した。

①ヒトのFasリガンドを導入したFasリガンド-L5178Y細胞を $1 \times 10^6$ 個/mlの濃度になるように、システインとメチオニンを含まない10%FCS・DME培地1mlで調製した。この細胞液に $^{35}$ S-Cys/Met(トランスラベル; ICN Biomedical Inc製)を3.7MBq/mlになるように加え、24ウエルのプレートで37℃にて16時間培養した。その後、培養上清を回収するとともに、細胞にはシステインとメチオニンを含む通常の10%FCS・DME培地を入れ、さらに4時間培養した。

## 【0095】

②細胞を回収した後、1mlの細胞溶解液(0.5%トリトンX-100、20mM Tris-HCl pH7.6、150mM NaCl、10μM PMSF、50μg/mlのトリプシンインヒビター)を加え、細胞を溶解させた。溶解は、氷上で1時間放置して行い、その後15,000rpm、15分間の遠心分離により、可溶化した細胞溶解液の上清を回収した。

①の培養上清と②の細胞溶解液に対し、コントロールとして、まず、マウスのIgGを結合させたセファロースビーズでプレクリアを行った。すなわち、IgG結合セファロースビーズ100μlを加え、4℃にて16時間反応させ、ビーズを遠心分離で除去することによりIgGに非特異的に結合する物質をとり除いた。

## 【0096】

次いで、NOK1の精製抗体と結合させたセファロースビーズを100μl(ビーズは50μl分)加え、さらに4℃にて16時間反応させた。遠心分離によりビーズに非吸着の部分を除去し、さらに、このビーズを細胞溶解液で2回遠心

洗浄した。このビーズに対し、 $20\mu l$ のSDS-PAGE用の還元用サンプルバッファーを入れ、5分間煮沸した。その後10%から20%の濃度勾配ゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後ゲルを取り出し、Amplify<sup>TM</sup> (Amersham Japan製)で、30分間インキュベートした。その後ゲルを乾燥し、X線フィルムで露光させた。その結果、図5に示すように、細胞(Cell)からは約40kdの膜型Fasリガンド分子を、細胞の培養上清(Sup)からは約27kdの可溶性Fasリガンド分子を検出した。比較対象として、NOK1-セファロースビーズに代えて、コントロールマウスIgG-セファロースビーズ(c Ig)を用いると何も検出できなかった。この結果、モノクローナル抗体NOK1は、Fasリガンド分子を免疫沈降できることがわかった。

## 【0097】

[実施例4] 可溶性Fasリガンドの定量

Fasリガンド抗体を組み合わせることで、可溶性Fasリガンドが定量できるか否かを検討した。

①可溶性Fasリガンドの調製

ヒトFasリガンド-L5178Y細胞を、無血清培地Excel1300<sup>TM</sup> (JRH Biociences製)にて大量に培養した。具体的には、 $1 \times 10^6$ 個/mlのFasリガンド-L5178Y細胞を1リットルのカルチャーバック(セキスイ製)30個を用い、合計30リットル培養した。培養は5日間を行い、その後1,000g、15分間の遠心分離により培養上清を回収した後、Minitan<sup>TM</sup> (ミリポア製)を用いて300mlに濃縮した。この濃縮したFasリガンド-L5178Y培養上清をNOK1-セファロースビーズを用いたカラムにて精製した。精製はカラムをFPLCに接続し、300mlの濃縮培養上清を吸着後、よくカラムを洗浄し、0.1Mのグリシン-塩酸pH3.0にて溶出した。これについてPBSを透析後、一部をSDS-PAGEし、ゲルを銀染色して、単一バンドであることを確認した後、バイオラッドのプロテインアッセイ液で、蛋白質量を測定した。今回の培養により $10\mu g$ の可溶性Fasリガンドを得た。これをスタンダードの可溶性Fasリガンドとした。

## 【0098】

②NOK1のビオチン化

モノクローナル抗体NOK1をビオチンでラベルした。方法は、常法に従い実施した。すなわち、10mg/mlにPBSで調製したモノクローナル抗体NOK1を0.1Mの炭酸緩衝液pH9.2に透析し、バッファー交換した。

この抗体液1mlに対し1mgのNHS-LC-Biotin(ピアス社製)を同炭酸緩衝液1mlに溶かしたものと0.2ml加え、室温で1時間反応させた。これをPBSにて1昼夜透析した。これをビオチン化モノクローナル抗体NOK1として用いることにした。

【0099】

③サンドイッチELISA(可溶性Fasリガンドの定量)

可溶性Fasリガンドの定量は、以下に述べるサンドイッチELISAのプロトコールにて実施した。サンプルは、可溶性Fasリガンド分子を用いて、スタンダードな標準曲線を作成した。

1) 96ウエルELISAプレート(住友ベークライト製No. MS-8996F)に対し、50μl/ウエルの割合で、NOK3抗体を(精製抗体を10μg/mlをPBSで希釈したもの)加えた。このプレートについて、4℃で16時間放置しモノクローナル抗体NOK3をプレート底面に固定した。なお、37℃で4時間放置し、モノクローナル抗体NOK3をプレート底面に固定してもよい。

2) 固定に用いたNOK3の溶液を捨てて、2倍にPBSで希釈したブロックエース(大日本製薬製)を200μl/ウエルで分注し、ブロッキングを行った。この処理は、37℃で2時間放置することで行った。

【0100】

3) ブロッキングに用いた液を捨て、可溶性Fasリガンド液をそれぞれ7ng/ml、3.5ng/ml、1.75ng/ml、0.875ng/ml、及び0.4325ng/mlの濃度に合わせ、各50μl/ウエルずつ分注した。その後、室温で1時間反応した。

4) 1時間後、0.05%のツイーン20が入ったPBSでプレートを5回洗浄した後、5μg/mlに5%のマウスの血清を含む0.05%のツイーン20

入りP B Sで希釈したビオチン化モノクローナル抗体NOK3を $50\mu l$ /ウェル分注し、さらに、室温で1時間反応させた。

【0101】

5) 同様に0.05%ツイーン20入りP B Sで5回洗浄後、150倍に0.05%ツイーン20入りP B Sで希釈したAB Complex液(ベクター社製)を $50\mu l$ /ウェル分注し、さらに、室温で1時間反応させた。

6) 0.05%ツイーン20入りP B Sで5回洗浄後、1mg/mlのオルトフェニレンジアミン(和光純薬製)、及び0.03%の過酸化水素水(和光純薬製)が入った0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム(pH5.0)緩衝液100 $\mu l$ /ウェル入れ、室温で約20分間反応させた。

7) その後、100 $\mu l$ /ウェル 2Nの硫酸を入れて、反応を停止し、490nmでの吸光度値をマイクロプレートリーダー(バイオラット製)にて測定した。

【0102】

その結果、可溶性Fasリガンドを定量することができた。そのときの標準曲線を図6に示す。

この図6に示すように、この方法では、少なくとも7ng/mlから0.4325ng/mlの可溶性Fasリガンドを検出することができるところがはじめて明らかになった。

【0103】

〔実施例5〕 血清中のFasリガンドの定量

実施例4のサンドイッチELISAのプロトコールを用いて、実際に以下に述べる疾患の血清を用いて血清中のFasリガンドを定量した。方法は、実施例4の③の3)にて、可溶性Fasリガンドのスタンダード、IM(伝染性単核球症)、SLE(全身性エリテマトーデス)、apla(再生不良性貧血)、GVHD(対宿主性移植片病)、VAHS(ウイルス関連血球貧食症候群)、肝炎、及び健常人の血清を用いて測定し、可溶性Fasリガンドの標準曲線によりそれらの血清中のFasリガンドを定量した。結果を図7に示す。図7から、IM、SLE、肝炎において、本方法により健常人より血清中のFasリガンドが高い

ことがわかり、これらの疾患の診断が本方法で行えることがはじめて明らかになった。

## 【0104】

## [実施例6] サルFasリガンドとの反応性の検討

アカゲザルよりヘパリン添加注射筒を用い、末梢血5mlを採血した。PBSにて2倍に希釈した後、セパレートLを用いて、リンパ球分画を比重遠心分離法にて回収した。このサルの末梢血単核球リンパ球をConA 10 $\mu$ g/ml入った10%FCS・RPMI1640培地で2日間培養し、活性化を行った。その後、遠心分離により細胞を回収後、ヒトIL-2（インターロイキン-2）が50units/ml入った10%FCS・RPMI1640培地にてさらに1週間培養した。1週間後、PMA 10ng/ml、及びイオノマイシン500ng/mlになるように添加し、さらに4時間活性化させた。このときBB94（マトリクスプロテアーゼインヒビター）を10 $\mu$ Mの割合で同時に添加した。これらの活性化により該リンパ球にFasリガンドを大量に発現させた。4時間後細胞を回収し、フローサイトメトリーにて解析した。まず細胞を回収後、細胞数をカウントし、PBSにて $1 \times 10^6$ 個/mlにした後、チューブ（ファルコンNo-2008）に1mlずつ入れた後、コントロールPBS 100 $\mu$ l、NOK1抗体1 $\mu$ g（10 $\mu$ g/ $\mu$ lの濃度になるようにPBSに希釈したもので100 $\mu$ l）、モノクローナル抗体NOK2も1 $\mu$ g（10 $\mu$ g/mlで100 $\mu$ l）、モノクローナル抗体NOK3も1 $\mu$ g（10 $\mu$ g/mlで100 $\mu$ l）を入れ、氷上で30分間反応させた。

## 【0105】

PBSによる遠心洗浄を2回行った後、PE-抗マウスIg'sを1 $\mu$ l入れさらに氷上で30分反応させ、PBS洗浄を行いPBS 200 $\mu$ lに懸濁した後FACScanにて解析した。

その結果、図8に示すごとく、モノクローナル抗体NOK1～NOK3のいずれも、蛍光強度（横軸）がコントロールとは違う箇所にピークが見られる。すなわち、各抗体がサルの細胞表面のFasリガンドと反応することが明らかとなつた。

【0106】

[実施例7] マウスFasリガンドの作用に対する抑制効果

ヒトFasリガンドを遺伝子導入した細胞hFasL/L5178Yのかわりに、マウスFasリガンドを遺伝子導入した細胞mFasL/L5178Yを用いて検討した。 $^{51}\text{Cr}$ を用いた細胞障害反応試験法を用いて行った。そのプロトコールを以下に示す。

①エフェクター細胞の調製

hFasL/L5178Y及びmFasL/L5178Y (hFasL/L5178Yと同様の方法で調製) のそれぞれを培養中のフラスコより回収し、10% FCS・RPMI1640培地で、 $1 \times 10^6$ 個/mlにした。

【0107】

②ターゲット細胞の調製

ヒトFas遺伝子を導入したhFas/WR及びその親株であるWRについて、 $5 \times 10^6$ 個/mlで $100\mu\text{l}$ に10% FCS・RPMI1640培地で調製した。次いで、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (ICN製) 3.7MBq分 (37MBq/mlで $100\mu\text{l}$ 分) 加え、37°Cにて1時間インキュベーションした。その後10% FCS-RPMI1640培地で3回遠心洗浄した後、 $1 \times 10^5$ 個/mlに同培地で希釈した。

【0108】

③細胞障害反応

96ウェル・マルチプレートU底 (コーニング製) にエフェクター細胞を $100\mu\text{l}$ /ウェル入れた。次いで、ハイブリドーマNOK1~NOK3の培養上清をFasリガンドに対する各モノクローナル抗体として用い、これらを $40\mu\text{l}$ /ウェル入れた。比較対照として抗体を入れないものを用いた。100%生存と100%死滅のコントロールを行うため、エフェクター細胞を入れず、培地を $100\mu\text{l}$ /ウェル入れたものを6ウェルつくった。次いで、各ウェルにターゲット細胞を $100\mu\text{l}$ /ウェルで加えた。先ほどの100%死滅には、さらに10% SDSを $20\mu\text{l}$ 入れた。

【0109】

その後、6時間反応（37℃デ5%CO<sub>2</sub>インキュベート）を行った後、プレートを遠心分離し、細胞をウェル底面に沈殿させた。上清液を100μlずつ回収し、γ線シンチレーションカウンター（ファルマシア製）にて上清中に遊離した<sup>51</sup>Crのカウントを求めた。その測定結果を図9に示す。なお、10%SDSを入れたウェルの平均を100%死滅、ターゲット細胞のみのところを100%生存として、キラー活性（細胞障害）を求めた。その結果、モノクローナル抗体NOK1～NOK3で代表されるヒトFasリガンドに対する抗体は、ヒトFasリガンドの作用は阻害するが、マウスFasリガンドの作用を阻害しないことがわかった。

## 【0110】

## [実施例8] 抗FasL抗体のV領域遺伝子シーケンス

ハイブリドーマNOK1～5を用いて、下記のプロトコールによりFasリガンドに対するモノクローナル抗体の可変領域（V領域）の遺伝子シーケンスを行った。

## 1. cDNAの調製

(1) ハイブリドーマNOK1～5のそれぞれを25cm<sup>3</sup>フラスコ中で培養した。培養細胞を回収して、PBSで遠心洗浄した後、1mlのPBSに懸濁し、細胞数を数えた。細胞1×10<sup>6</sup>個を無菌のエッペンドルフチューブに入れ、遠心分離で上清を抜き取り、ペレットをタッピングした。

(2) RNA<sub>Z01B</sub>（コスマバイオ製）を200μl加え、ピペットマンのチップでよく攪拌して細胞を溶かした。クロロホルムを20μl添加し、振盪後、氷中に5分間放置した。4℃で15,000rpm、15分間遠心した後、上層の無色透明の部分を回収し、新しいチューブに移した。4℃で15,000rpm、15分間遠心した後、上清を捨てて、ペレットに75%エタノールを800μl加え、-20℃で30分間放置した。4℃で15,000rpm、15分間遠心した後、ペレットに蒸留水11.5μl添加した。

(3) オリゴdT(0.5mg/ml)を0.5μl添加して、70℃で10分間、氷上で5分間放置した。

## 【0111】

## 【表3】

5 x RT buffer	4 $\mu$ l
10 mM dNTPmix	1 $\mu$ l
Superscript RTase (Stratagene製)	1 $\mu$ l

## 【0112】

を加え、42℃で50分間、90℃で5分間、氷上で5分間放置した。

(4) RNase Hを1  $\mu$  l添加し、37℃で20分間放置した。このようにして、cDNA混合物を調製した。

## 【0113】

2. PCR反応

(1) 前記で得られたcDNAを用い、下記の条件でPCR反応を行った。

## 【0114】

## 【表4】

	VH	VL
cDNA	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
dNTPmix	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
primer (Pharmacia製)	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l
10 x PCR buffer	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
DDW	30.5 $\mu$ l	31.5 $\mu$ l
Amplici-Tag	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l

## 【0115】

ミネラルオイル40  $\mu$  lを重層し、94℃で5分間放置した後、「55℃で2分間、72℃で3分間、94℃で1分間」のサイクルを30サイクル行い、次いで、55℃で2分間、72℃で10分間放置した。

(2) 反応液4  $\mu$  lをミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)でチェック

した。結果を図10に示す。モノクローナル抗体NOK3のL鎖を除いて、PCRによりDNA断片が増幅したことが確認された。

## 【0116】

3. VH及びVLフラグメントの回収

(1) 上記で調製したPCR生成物をミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)させて、VH(H鎖V領域)及びVL(L鎖V領域)のバンドをゲルから切り出した。

(2) Gene CleanでPCR生成物を回収し、ミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)でバンドをチェックした。例として、NOK4のVHについての結果を図11に示す。

4. ライゲーション

下記TAクローニングキットを用い、DNAの連結反応(Ligation)を行った。

## 【0117】

## 【表5】

ADDW	5 μl
10x Ligation buffer	1 μl
PCRベクター	2 μl
PCR生成物	1 μl
T4DNA Ligase	1 μl

14℃で一晩反応を行い、ライゲーション混合物を得た。

## 【0118】

5. トランスフォーメイション

TAクローニングキットを用いて形質転換(Transformation)を行った。

(1) 氷上で細胞50μlに、0.5Mのβメルカプトエタノール2μl、及び前記で調製したライゲーション混合物を添加し30分間放置した後、42℃の湯浴中に30秒間、次いで、氷上に20分間放置した。450μlのSOC培地を

加え、37℃で1時間(225 rpm)インキュベートした。

(2) 次いで、LB agarプレート(+Amp, X-Gal, IPTG)に拡散した。各サンプルは、 $50\mu l$ 、 $100\mu l$ 、 $200\mu l$ であった。37℃で18時間インキュベートした後、4℃で2時間放置したところ、白と青のコロニーが発現した。

【0119】

6. ミニ培養(Mini Culture)

(1) 前記各サンプルのプレートから白いコロニーを4個ずつ拾った。  
(2) 3mlのLB培地(+Amp)に1個のコロニーを加え、37℃で一晩振盪した。

【0120】

7. ミニ調製(Mini Preparation)

(1) 培養溶液1. 5mlをエッペンドルフチューブに取った。(保存用としてLBプレートに拡散して37℃で培養した。) 4℃で6,000 rpm、2分間遠心した。

(2) ppt. + $100\mu l$ 溶液1(リゾチーム5mg/ml)を加え、室温で5分間放置した後、 $200\mu l$ の溶液2(氷上で穏やかに5分間混合)を添加し、 $150\mu l$ の溶液3(氷上で15分間混合)を添加し、次いで、4℃で12,000 rpm、5分間遠心した。

(3) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のフェノールを添加し、次いで、室温で12,000 rpm、1分間遠心した。

(4) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のCHC<sub>13</sub>:iAA(99:1)混合物を加え、室温で12,000 rpm、1分間遠心した。

【0121】

(5) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、 $1\mu l$ のMus seleグリコーゲンと $900\mu l$ のエタノールを添加し、-80℃で30分間放置した後、4℃で15,000 rpm、5分間遠心した。

(6) 沈殿物を乾燥した。 $20\mu l$ のTE及び $1\mu l$ のRNase A(5mg

/ml) を加え、65°Cで20分間放置した。

(7) このようにして、プラスミドDNAを得た、

(8) 下記の条件でミニゲル電気泳動を行い、バンドをチェックした。NOK4V<sub>L</sub>、NOK5V<sub>H</sub>、NOK5V<sub>L</sub>の結果を図12に示す。

### 【0122】

#### 【表6】

H Bu f.	1 μl
EcoRI	1 μl (IU)
DNA	1 μl
ADDW	7 μl

37°Cで1時間インキュベートした後、0.75%アガロースゲルに加えて電気泳動を行った。

### 【0123】

#### 8. DNAシーケンス

(1) プラスミドDNAを1μlとり、99μlのTEにて希釈した。

(2) A<sub>260</sub>を測定し、DNA値を計算した (A<sub>260</sub> of 1.0 = 50 μg/ml)。

(3) A<sub>260</sub>値より、DNAが1μg/μlとなるようにTEにて希釈した。

(4) Dyeターミネーター法により、DNAシーケンス (ABIモデル373 A)を行った。

### 【0124】

#### 9. V領域の解析

このようにして得られたDNAシーケンスをもとに、V領域のアミノ酸配列をコンピュータ解析により求めた。結果を図13 (モノクローナル抗体NOK1~5のV<sub>H</sub>領域のアミノ酸配列)、及び図14 (モノクローナル抗体NOK1、2、4、5のV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列)に示す。これらの図において、四角の線で囲った箇所は、超可変領域 (CDR1~3) である。

### 【0125】

### 【発明の効果】

本発明のFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、Fasリガンドに特異的に反応することから、例えば、Fas抗原とそのリガンドとの相互作用の解析を行うことにより、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構やFasのシステムを解明することができる。

本発明のFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、免疫治療や診断、及びこれらに関連した産業分野において有用である。すなわち、Fasリガンドに対する抗体を血液中の細胞と反応させ、蛍光標識の2次抗体をさらに結合させ、フローサイトメトリーあるいは蛍光顕微鏡で測定すれば、Fasリガンドがどの細胞に発現されているかを見極めることができる。Fasリガンドに対するモノクローナル抗体をFITC、PEのような蛍光色素に結合させることは容易であり、したがって、2次抗体を使用せずに解析することができる。また、複数のモノクローナル抗体を組み合わせることによりFasリガンドの濃度の検出も可能であり、これらにより診断や基礎研究の分野で非常に有用である。

### 【0126】

種々の疾患（例えば、自己免疫疾患、リューマチ、肝炎など）の患者から取り出した組織等に対し、本発明のモノクローナル抗体で反応させて、Fasリガンドを発現している細胞が組織のどこに存在しているかを調べることができる。これにより、各種疾患の診断や治療へつなげることが可能となる。Fasリガンドに対するモノクローナル抗体は、Fasリガンドの反応（結合）を阻害することから、肝炎やリューマチ等の疾患の治療に有用なものとなる。また、本発明のモノクローナル抗体から、抗体産生遺伝子を合成し、Fasリガンドとの結合にかかる部分のみをヒトのIgG型の抗体に移植すれば、ヒト型抗体を得ることができ、上述の多くの疾患の治療に有用となる。

### 【0127】

本発明のモノクローナル抗体は、サルのFasリガンドにも反応することからエイズ治療、ウイルス性肝炎等をはじめとする治療用抗体の検討に有用であるとともに、新しい治療薬のスクリーニングにおいて効果をモニターできるので非常に有用である。とくにウイルス感染症等は、マウスでは実験系がくめないケース

が多いため、ヒトとサルに反応することは大きなメリットである。

また、本発明のモノクローナル抗体は、マウスのFasリガンドと反応しないことは、SCIDマウス等での検討でも役立つ。ヒトの細胞をマウスに移植した後の作用等を特異的に阻害させたり、モニターするのにも有用となる。

【0128】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：120

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp

20 25 30

Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Asp Asn Gly Lys Phe Lys

50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Ser Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Pro Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

【0129】

配列番号：2

配列の長さ：360

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TCC TGG	96
ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA AAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA	144
CGA ATT TAT CCT GGA GAT GGA GAT ACT AAC GAC AAC GGG AAG TTC AAG	192
GGC AAG GCC ACA CTG ACC GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTC AGC AGT CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAC TTC TGT GCA	288
AGA TCG TAT TAC TAC GAT GGT AGC CCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA	336
GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	360

【0130】

配列番号：3

配列の長さ：108

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Phe Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

【0131】

配列番号：4

配列の長さ：324

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GAC ATC CAG ATG ACG CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA	48
GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAT TAT	96
TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC	144
TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC	192
AGT GGG TCT GGG ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AAC CTG GAA CCT	240
GAA GAT ATT GCC ACT TAC TTT TGT CAG CAA TAT AGT GAA TTT CCG TGG	288
ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG	324

【0132】

配列番号：5

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser

1 5 10 15

Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

20 25 30

Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Tyr Leu Tyr Pro Gly Gly Leu Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Tyr Arg Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

【0133】

配列番号：6

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGA GCT GAG CTG GTA AGG CCT GGG ACT TCA	48
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT GCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAC TGG	96
ATA GGT TGG GTA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT GAG TGG ATT GGA	144
TAT CTT TAC CCT GGA GGT CTT TAT ACT AAC TAC AAT GAG AAG TTC AAG	192
GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCC ATC TAT TAC TGT GCA	288
AGA TAC AGG GAT TAC GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC	336
ACG GTC ACC GTC TCC TCA	354

[0134]

配列番号：7

配列の長さ：113

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser			
20	25	30	
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser

85

90

95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

## 【0135】

配列番号：8

配列の長さ：339

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCT CTG CCT GTC AAT ATT GGA	48
GAT CAA GCC TCT ATC TCT TGC AAG TCT ACT AAG AGC CTT CTG AAT AGT	96
GAT GGA TTC ACT TAT TTG GGC TGG TGC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT	144
CCA CAG CTC CTA ATA TAT TTG GTT TCT AAT CGA TTT TCT GGA GTT CCA	192
GAC AGG TTC AGT GGT AGT GGG TCA GGG ACA GAT TTC ACC CTC AAG ATC	240
AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAT TGC TTC CAG AGT	288
AAC TAT CTT CCT CTT ACG TTC GGA TCG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA	336
CGG	339

## 【0136】

配列番号：9

配列の長さ：116

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1

5

10

15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp

20

25

30

Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35

40

45

Arg Ile Tyr Pro Val Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

50

55

60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65

70

75

80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala

85

90

95

Thr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

【0137】

配列番号：10

配列の長さ：348

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TCC TGG	96
ATG AAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGG AAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA	144
CGG ATT TAT CCT GTA AAT GGA GAT ACT AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG	192
GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAC TTC TGT GCA	288
ACC GAT GGT TAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC	336
ACC GTC TCC TCA	348

【0138】

配列番号：11

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser			
1	5	10	15
Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
50	55	60	
Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu			
65	70	75	80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Val Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

## 【0139】

配列番号：12

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG TCT	48
CTG TCT CTC ACC TGC TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGT TAT	96
TAC TGG AAC TGG ATC CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG	144
GGC TAC ATA AGC TAC GAT GGT AGC AAT AAC TAC AAC CCA TCT CTC AAA	192
AAT CGA ATC TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT AAG AAC CAG TTT TTC CTG	240
AAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCC	288
GTT TAT TAC TAC GAT GGT AGC TCT TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC	336
ACG GTC ACC GTC TCC TCA	354

## 【0140】

配列番号：13

配列の長さ：112

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Gly Val Asp Ser Tyr

20

25

30

Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Tyr Leu Lys Ser Gly Val Pro Ala

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65

70

75

80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85

90

95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

110

【0141】

配列番号：14

配列の長さ：336

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

## 配列

GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA AGG	48
CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA GGT GTT GAT AGT TAT	96
GGC ATT AGT TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC	144
AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC TAC CTA AAA TCT GGG GTC CCT GCC	192
AGG TTC AGT GGT AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT GAT	240
CCT GTG GAG GCT GAT GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AAT AAT	288
GAG GAT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG	336

【0142】

配列番号：15

配列の長さ：117

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Pro Ala Lys Pro Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp			
20	25	30	
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
35	40	45	
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys			
50	55	60	
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met			
65	70	75	80
Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
100	105	110	

Val Thr Val Ser Ser

115

【0143】

配列番号：16

配列の長さ：351

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAA CCG GCA AAA CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT ACC TAC TGG	96
ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA	144
TAC ATT AAT CCT AGC AGT GGT TAT ACT GAG TAC AAT CAG AAG TTC AAG	192
GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTA ATC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA	288
AGA AGG GGT AAT TAC TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG	336
GTC ACC GTC TCC TCA	351

【0144】

配列番号：17

配列の長さ：105

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu  
 100 105

【0145】

配列番号：18

配列の長さ：315

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA AAA TTC CTG CCT GTA TCA GCA GGA	48
GAC AGG GTT ACC ATG ACC TGC AAG GCC AGT CAG AGT GTG GGT AAT AAT	96
GTG GCC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA	144

特平 7-303492

TAC TAT ACA TCC AAT CGC TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACT GGC	192
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GTT	240
GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG CAT TAT AGC TCT CCG TAT	288
ACG TTC GGA TCG GGG ACC AAG CTG GAG	315

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、 F a s リガンド - L 5 1 7 8 Y 細胞の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。

【図 2】

図 2 は、 L 5 1 7 8 Y 親株の N O K 5 抗体無添加の場合の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。

【図 3】

図 3 は、 L 5 1 7 8 Y 親株の N O K 5 抗体添加の場合の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。

【図 4】

図 4 は、 F a s リガンドの細胞障害性に対する、 F a s リガンドに対するモノクローナル抗体及び F a s - I g の抑制効果を示すグラフである。

【図 5】

図 5 は、モノクローナル抗体 N O K 1 による F a s リガンド分子の免疫沈降結果を示す図である。

【図 6】

図 6 は、 2 種類の F a s リガンドに対するモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ E L I S A 法による可溶性 F a s リガンドの定量結果を示すグラフ（標準曲線）である。

【図 7】

図 7 は、各疾患における血清中の可溶性 F a s リガンド量の測定結果を示すグラフである。

【図 8】

図 8 は、活性化サル末梢血単核細胞表面にある F a s リガンドに対するモノクローナル抗体の反応性解析結果を示す F A C S c a n チャートである。

【図 9】

図 9 は、 F a s リガンドと F a s を介した細胞障害反応における F a s リガンドに対する抗体の抑制効果を示すグラフである。

【図10】

図10は、抗FasL抗体のVHの遺伝子及びVLの遺伝子のPCR反応液のミニゲル電気泳動図である。

【図11】

図11は、NOK4のVHの遺伝子のPCR生成物のミニゲル電気泳動図である。

【図12】

図12は、プラスミドDNAのミニゲル電気泳動図である。

【図13】

図13は、モノクローナル抗体NOK1～5のVH領域（H鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CDR1～3）である。

【図14】

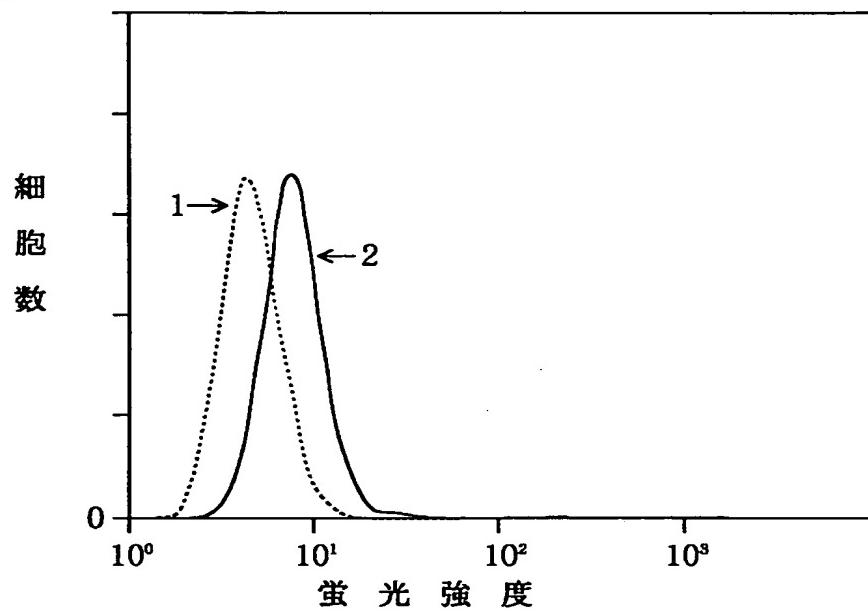
図14は、モノクローナル抗体NOK1、2、4、5のVL領域（L鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CDR1～3）である。

【符号の説明】

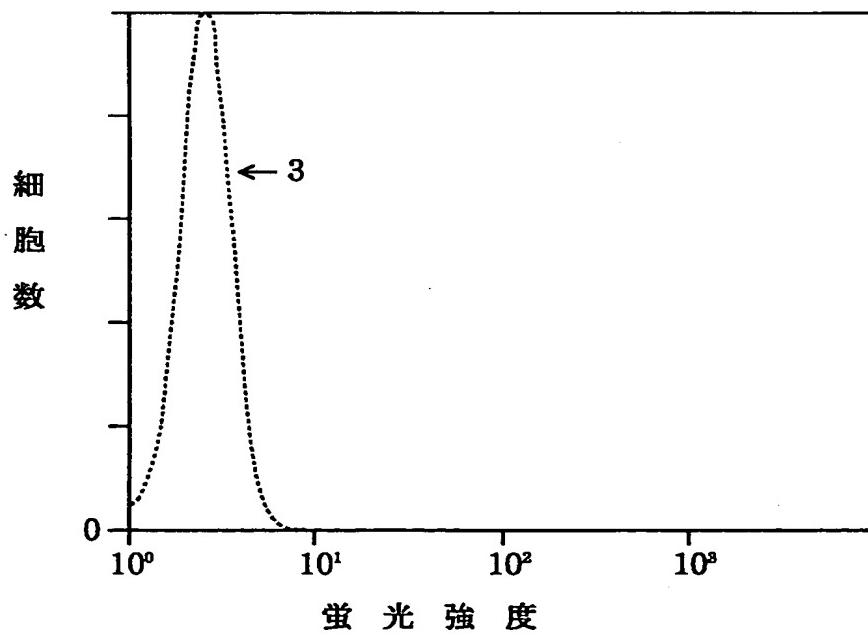
- 1 : NOK5抗体なし
- 2 : NOK5抗体添加
- 3 : NOK5抗体なし
- 4 : NOK5抗体添加

【書類名】 図面

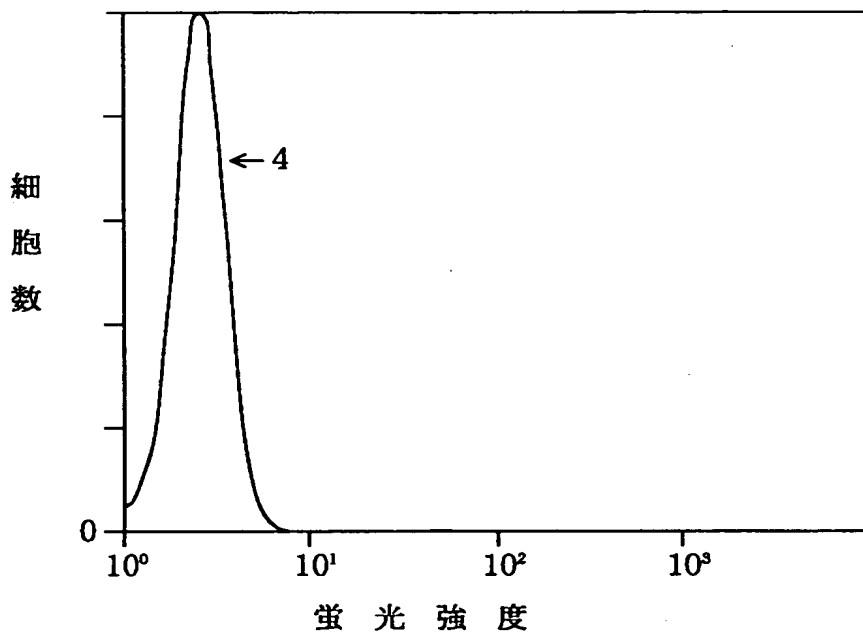
【図 1】



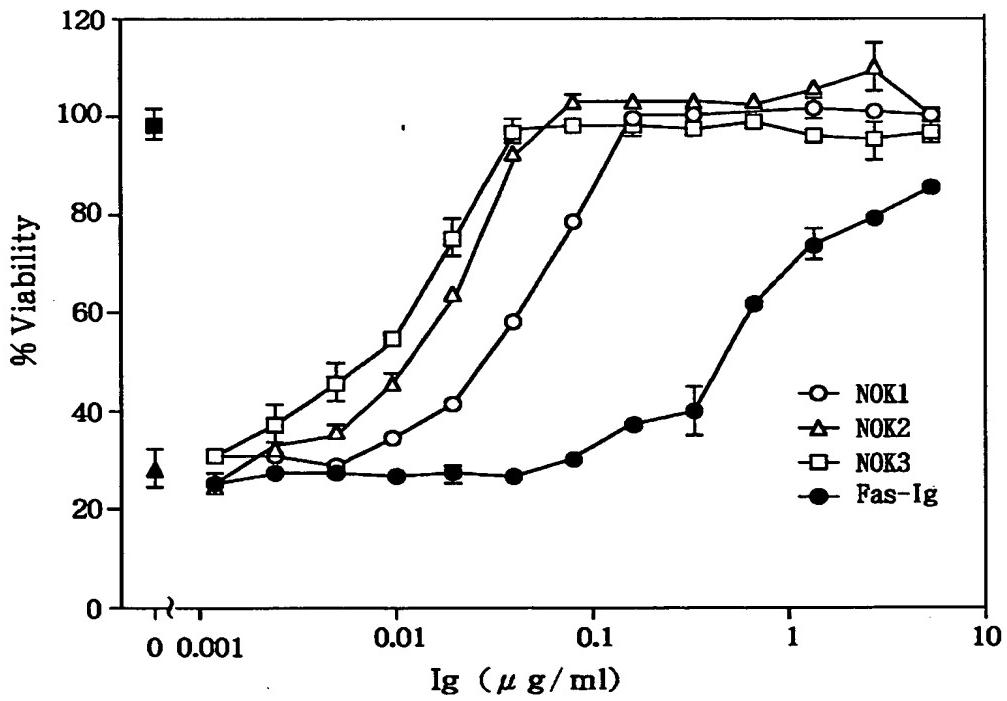
【図 2】



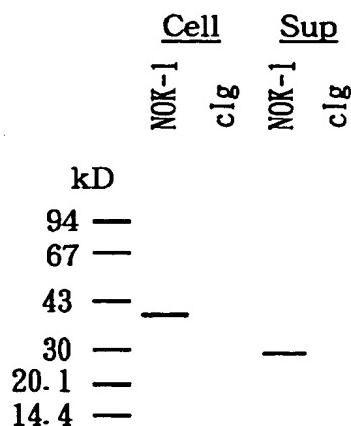
【図 3】



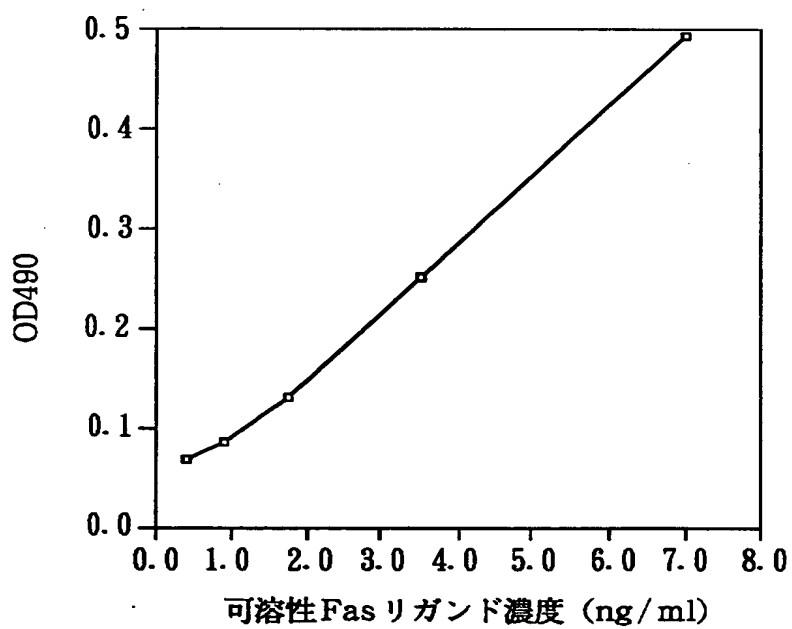
【図4】



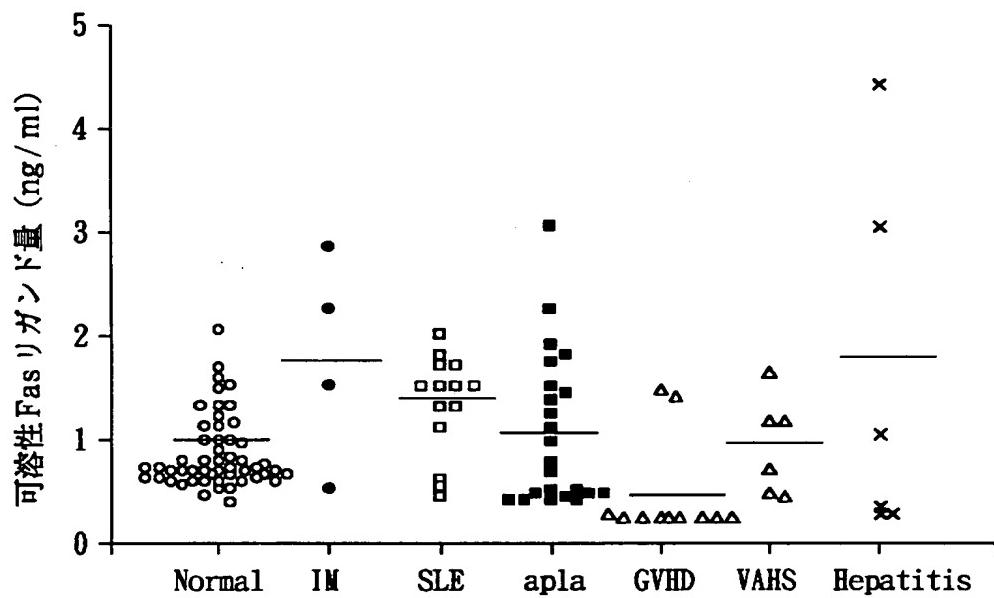
【図5】



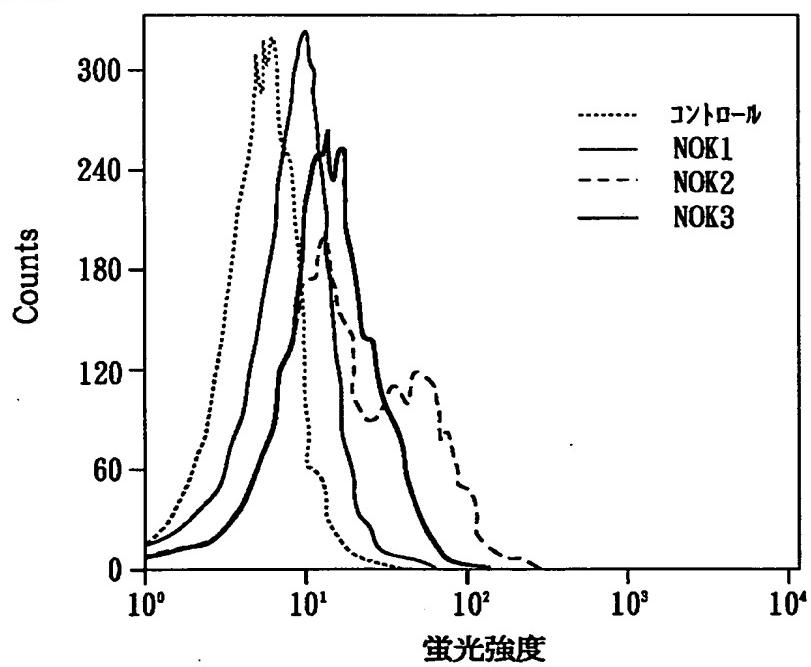
【図6】



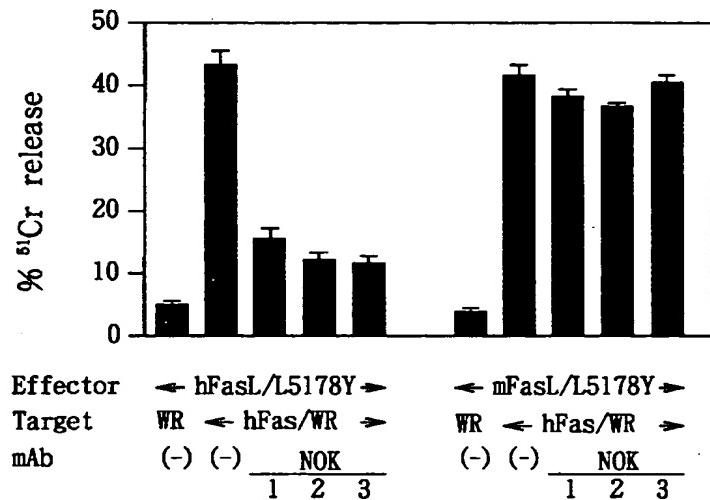
【図7】



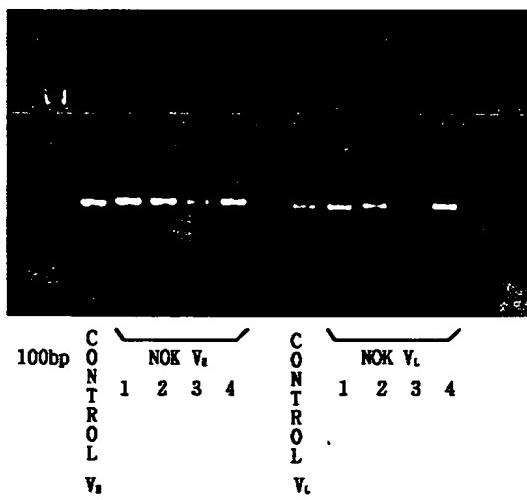
【図8】



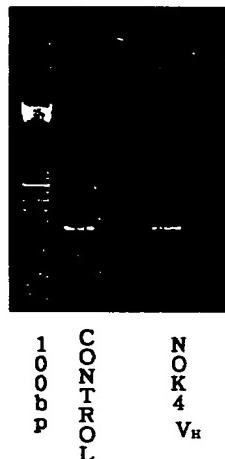
【図9】



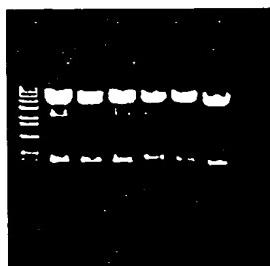
【図 10】



【図 11】



【図12】



1 NOK4 NOK5 NOK5  
 K V<sub>L</sub> V<sub>I</sub> V<sub>L</sub>  
 b  
 p

【図13】

		CDR1	CDR2	
NOK1VH . amino	1:VQLQESGPVELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPGDGDTN	58	
NOK2VH . amino	1:VQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTF	TNYWIGWVKQRPGHGLEWIGYLYPGGLYTN	58	
NOK3VH . amino	1:VKLQESGPVELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPVNNGDTN	58	
NOK4VH . amino	1:VQLQESGPGLVKPSQSLSLTCVTGYSITSGYYW-NWIRQFPGNKLEWMG-YISYDGSNN		58	
NOK5VH . amino	1:VQLQESGAEPAKPGASVKMSCKASGYTF	TTYWMBWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTE	58	
	* * * *	* * * **	* * * *** *** *	

		CDR3	
NOK1VH . amino	59:DNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAYFCARSYYYDGSPW-FTYWGGQGTTVT	117	
NOK2VH . amino	59:YNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIIYCARYRDYD-YAMDY-WGQGTTVT	115	
NOK3VH . amino	59:YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAYFCA-T-DGY-WYFDWVGQGTTVT	113	
NOK4VH . amino	59:YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATIYYCA-VYYYDG-SSFDWVGQGTTVT	115	
NOK5VH . amino	59:YNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYCARRGNY-YYFDY-WGQGTTVT	114	
	* *	***	***** * * ***

NOK1VH . amino	118:VSS	120
NOK2VH . amino	116:VSS	118
NOK3VH . amino	114:VSS	116
NOK4VH . amino	116:VSS	118
NOK5VH . amino	115:VSS	117
	***	

【図14】

		CDR1		CDR2	
NOK1VL . amino	1:DIQMTQSPSSLSASLGDRVТИСQRASQDИSNY-----LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLH	*	*	*	55
NOK2VL . amino	1:DVLMTQTPPLSLPVNIGDQASISCKSTKSSLNSDGFTYLQWCLQKPGQSPQLLIYLVSNRF	*	*	*	60
NOK4VL . amino	1:DIVLTQSPASLAVSLRQRATИСQRASEGVDSY-GISFMHYYQQKPGQPPKLLIYRASYLK	*	*	*	59
NOK5VL . amino	1:DVLMTQTPKFLPVSAGDRVТИСKAQS-V---G-NNVAWYQQKPGQSPKLLIYHTSNRY	*	*	***	55
		*    *** *    *	*    *	*    ***    ***	*
		CDR3			
NOK1VL . amino	56:SGVPSRFSGSGSGTIDYSLTISNLLEPEDIAATYFC	QQYSEFPWIFGGGTKLEIKR			108
NOK2VL . amino	61:SGVPDRFSGSGSGTIDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNY-LPLTFGSGTKLEIKR				113
NOK4VL . amino	60:SGVPARFSGSGSGRTDFTLTIDPVEADDAATYYC	QQNNEDPWIFGGGTKLEIKR			112
NOK5VL . amino	56:TGVPDRFTGSGSGTIDFTFTISSVQVEDLAVYFC	QQHYSSPYIFGSGTKLE			105
		*** * * **** *    *    *    * * * *    *    *** *****			

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞表面に存在する Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供すること。該モノクローナル抗体の H鎖及び L 鎖の可変領域及び超可変領域のアミノ酸配列、及びそれをコードする DNA または RNA の塩基配列を決定すること。溶液中の Fas リガンドを検出する方法、及び Fas リガンド検出用キットを提供すること

【解決手段】 Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法。細胞表面に存在する Fas リガンドまたは可溶性リガンドに特異的に反応するモクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。溶液中の Fas リガンドを検出する方法。Fas リガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせてなる Fas リガンド検出用キット。

【選択図】 なし

【書類名】 物件提出書  
〔特許〕 平07-303492(07.10.27)

〔受付日〕 平07.11.02 96.04.02 10:17  
16A319c5 頁： 1/1

【書類名】 物件提出書  
【提出日】 平成7年11月1日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願日】 平成7年10月27日提出の特許願  
【整理番号】 95Y A 0 4 3 2  
【発明の名称】 Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその製造方法  
【提出者】  
【事件との関係】 特許出願人  
【識別番号】 0 0 0 0 2 1 3 0  
【氏名又は名称】 住友電気工業株式会社  
【代表者】 倉内 憲孝  
【代理人】  
【識別番号】 1 0 0 0 9 3 5 2 8  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西川 繁明  
【提出する物件】 受託証の写 4

[書類名] 物件提出書

[受付日] 平07.11.02 96.04.02 10:17

[特許] 平07-303492(07.10.27)

16A319c5 頁: 1/5

国際様式 INTERNATIONAL FORM



〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
Identified at the bottom of this  
page.

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
代表取締役 金内 宏孝  
寄託者 あて名: ㊞ 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK1	(受託番号) FERM BP- 5044
II. 科学的性質及び分類学上の位置 1個の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託 本国際寄託当局は、平成 7年 3月 20日 (原寄託日) に受領した1個の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領 本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に1個の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Science and Technology Agency of Natural Resources and Environment National Institute of Technology and Evaluation 名称: Agency of Natural Resources and Environment 所長 榎木 勝 Osamu Kashiwagi DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市東大路1丁目1番3号 (郵便番号305- 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN)	

平成 7年 (1995) 3月 20日

[書類名] 物件提出

[受付日] 平07.11.02 96.04.02 10:17

[特許] 平07-303492(07.10.27)

16A319c5 頁： 2/5

国際様式 INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
Identified at the bottom of this  
page.

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
施行される

原寄託についての受託証

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
代表取締役 金内 寛幸  
寄託者 殿

あて名 ☺ 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK2	(受託番号) PERM BP- 5045
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国际寄託当局は、平成 7年 3月 20日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国际寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所	
National Institute of Science and Human-Technology 名称: Agency of Natural Science and Technology 所長 仙木 勲 Osamu Sanagi DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県水戸市塙町1丁目1番3号（郵便番号305） 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN	
平成 7年(1995) 3月 20日	

[書類名] 物件提出書  
[特許] 平07-303492(07.10.27)

[受付日] 平07.11.02 96.04.02 10:17  
16A319c5 頁: 3/5

国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

原寄託についての受託証

氏名(名称) 住友電気工業株式会社  
代表取締役 金内 重幸  
寄託者 職名 ㊞ 541  
あて名 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK 3	(受託番号) FERM BP- 5046
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
1個の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7年 3月 20日(原寄託日)に受領した1個の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1個の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Natural Science and Technology 所長 鈴木 勉 Osamu Suzuki, D.Eng., DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号(郵便番号305) 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN	
平成 7年(1995) 3月 20日	

[書類名] 物件提出

[受付日] 平07.11.02 96.04.02 10:17

[特許] 平07-303492(07.10.27)

16A319c5 頁: 4/5

国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
Identified at the bottom of this  
page.

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
寄託者 代表取締役 倉内 達孝 殿  
あて名 ㊞ 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) NOK4	(受託番号) FERM BP- 5047
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7年 3月 20日（原寄託日）に受領した1種の微生物を受託する。	
IV. 参照請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1種の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への参照請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Science and Human-Technology Agency of Natural Resources and Energy National Institute of Science and Technology 所長 井木 朝一 Osamu IIZUMI, Director General. あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305） 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 7年(1995) 3月 20日	

[書類名] 物件提出

[受付日] 平07.11.02 96.04.02 10:17

[特許] 平07-303492(07.10.27)

16A319c5 頁: 5/5

国際模式 INTERNATIONAL FORM



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
Identified at the bottom of this  
page.

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

氏名（名前） 住友電気工業株式会社  
寄託者 代表取締役 倉内 恵志  
あて名 ④ 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

殿

I. 微生物の表示	
(受託者が付した識別のための表示) NOK5	(受託番号) PERM BP- 5048
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7年 3月 20日（原寄託日）に受領した1種の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1種の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Science and Human-Technology 名称: Agency of Industrial Science and Technology 所長 鈴木 俊一 Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市篠崎1丁目1番3号（郵便番号305） 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 7年(1995) 3月 20日	

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002130

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番 33 号

【氏名又は名称】 住友電気工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093528

【住所又は居所】 東京都荒川区東日暮里 3 丁目 43 番 8 号 ビジュアル・シティー 401 号

【氏名又は名称】 西川 繁明

[書類名] 権利訂正データ

[作成日] 00.00.00 96.04.02 10:17

[特許] 平07-303492(07.10.27)

[担当者コード] 7285 16A319c5 頁: 1/1

【類名】

権利訂正データ

【訂正書類】

物件提出書

<認定情報・付加情報>

【提出者】

【識別番号】 000002130

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

【氏名又は名称】 住友電気工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100093528

【住所又は居所】 東京都荒川区東日暮里3丁目43番8号 ビジュアル・シティー401号

【氏名又は名称】 西川繁明

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 受託証の写 1

出願人履歴情報

識別番号 [000002130]

1. 変更年月日 1990年 8月29日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号  
氏 名 住友電気工業株式会社